

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA DO
MEIO AMBIENTE

RYKELLY FARIA CAMPOS

**ESTUDO DO POTENCIAL DE REMOÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS NA ÁGUA COM APLICAÇÃO DE ENZIMAS
FÚNGICAS**

GOIÂNIA – GO

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA DO
MEIO AMBIENTE

RYKELLY FARIA CAMPOS

**ESTUDO DO POTENCIAL DE REMOÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS NA ÁGUA COM APLICAÇÃO DE ENZIMAS
FÚNGICAS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Civil da Universidade
Federal de Goiás, como requisito para obtenção de Mestre
em Engenharia do Meio Ambiente

Área de Concentração: Recursos Hídricos e Saneamento
Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago.

GOIÂNIA – GO

2011

FICHA AVALIATIVA DE APROVAÇÃO

RYKELLY FARIA CAMPOS

**ESTUDO DO POTENCIAL DE REMOÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA
ÁGUA COM APLICAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do grau de mestre, defendida e aprovada em 02/09/2011, pela Banca Examinadora constituída pelos professores.

Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago

Presidente da banca (orientadora) – PPGEMA/UFG – GO

Prof. Dr. Edson Pereira Tangerino

UNESP – SP

Profa. Dra. Kátia Alcione Kopp

PPGEMA/UFG –GO

Warde Antonieta de Fonseca Zang

IFG – GO

Dedico este trabalho:

*Ao Nosso Senhor Deus pai todo poderoso que amo acima de tudo.
Sem ele nada disso teria sido possível.*

*Aos meus Pais, LUZIA HELENA e AFONSO CAMPOS pela educação
e o grande amor que me proporcionaram, eternos agradecimentos à
você, por seus esforços imensuráveis, que favoreceram minha
chegada até aqui! Amo muito vocês!!!*

*Ao meu namorado Guilherme Rodrigues, por fazer parte da minha
vida e alegrar meus dias...*

*Sem você, minha vida perde toda a graça.
Perfeito, muito obrigado por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo seu amor, sabedoria, saúde e paz tão necessários para a realização deste trabalho.

À FAPEG – GO, pelos oito meses de bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.

A equipe do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise da Faculdade de Farmácia da UFG;

A equipe do laboratório de Controle de qualidade de medicamentos da faculdade de farmácia da UFG– LCQM, em especial a Viviane e ao Elvis pela grande colaboração nas análises;

Ao professor José Realino, pela colaboração e ajuda;

A minha orientadora, professora Mariângela, pela motivação e ensinamentos;

A Vilma e Luciana pelo apoio nos ensaios realizados na SANEAGO;

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial a amiga Karina, pelas maravilhosas horas de descontração e companherismo;

Aos professores do programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente (PPGEMA).

Aos meus familiares, meu pai Afonso Campos, minha mãe Luzia Helena, minhas irmãs, Rykeny, Rykeyla, Reylla, meus sobrinhos lindos e ao meu namorado e amigo Guilherme Rodrigues pelo amor, dedicação e paciência.

Meus sinceros agradecimentos.

CAMPOS, R. F. **ESTUDO DO POTENCIAL DE REMOÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA ÁGUA COM APLICAÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS.** Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Escola de Engenharia Civil, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

RESUMO

As substâncias húmicas (SHs), matéria orgânica em diferentes estágios de degradação são formadas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente, sendo importante a sua remoção já que elas podem conferir características indesejáveis à água distribuída. A utilização de microrganismos como os fungos, para essa remoção é de extrema importância, pois estes exercem papel importante dentro do saneamento atuando nos processos de transformação dos resíduos orgânicos, onde funcionam como recicladores de matéria nos diversos ecossistemas. O trabalho teve o objetivo de estudar a produção de enzimas fenoloxidasas e peroxidases por fungos de decomposição branca (*Trametes villosa* e *Pycnosporus sanguineus*) para a remoção das SHs na água. O trabalho foi dividido em partes: extraiu, purificou e caracterizou-se os ácidos húmicos e fúlvicos. Em seguida, colocou-se as SHs em água e utilizou-se as enzimas fúngicas para a sua remoção, também foram realizados ensaios em reator estático (Jar Test). A análise da composição das SHs (caracterização) e verificação de degradação foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, e espectroscopia de infravermelho e através da determinação da produção enzimática. O método de extração utilizado foi eficaz nas separações dos ácidos húmicos e fúlvicos; os espectros dos ácidos húmicos extraídos apresentaram grupos carboxílicos, alquílicos, aromáticos, alcoólicos, fenólicos e carboidratos. A enzima predominante em todas as espécies fúngicas utilizadas foi a lacase (Lcc); as amostras analisadas de *Trametes villosa* foram as que apresentaram maior diminuição nas absorvâncias em vários comprimentos de ondas nos espectros de ultravioleta/visível (UV-Vis), medida indireta de degradação. As amostras contendo o fungo de *Trametes villosa* também foram as que obtiveram uma maior produção enzimática de lacase, na maioria dos ensaios, chegando a uma produção de 3,48 U.mL⁻¹ com ácido húmico da marca Sigma-Aldrich® e 2,61 U.mL⁻¹ para o ácido húmico extraído e obtendo um índice percentual de remoção de 56% e 42% destes ácidos respectivamente. Nos ensaios com ácido fúlvico e fungos em diferentes pHs (3,0, 5,0 e 7,0), todos apresentaram diminuição do espectro de UV/Vis com índices percentuais de remoção de 92%. *T. villosa* foi o que apresentou índices maiores de adsorção comprovados por espectro no UV-Vis, ainda que em menor proporção que os tratados com enzimas, seu maior índice percentual de adsorção foi de 86%. Os fungos do presente estudo apresentam grande potencial de remoção e de adsorção das substâncias húmicas presentes na água.

Palavras-chave: ácidos húmico, ácidos fúlvico, fungos de decomposição branca

CAMPOS, R. F. STUDY OF POTENTIAL REMOVAL OF HUMIC SUBSTANCES IN THE WATER WITH APPLICATION FUNGAL ENZYMES. 2011. 132 f. Dissertation (Masters of Environmental Engineering) - Civil Engineering College, Post-Graduation *Stricto Sensu* Program in Environmental Engineering - Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, 2011.

ABSTRACT

The humic substance (SHs), organic matter in different stages of degradation are formed during the decomposition of plant and animal residues in the environment, it is important to remove them, as they can give undesirable characteristics to the water distributed. The use of microorganisms such as fungi, for this removal are extremely important, since their role in sanitation is to act on processing organic waste, where they function as recyclers of matter in different ecosystems. This work aimed to study the production of phenol oxidase enzymes, peroxidases white decomposition by fungi (*Trametes villosa* and *Pycnoporus sanguineus*) for the removal of HSs in the water. The work was divided into parts: extracted, purified and characterized the humic and fulvic acids, was placed just after the HSs in water and we used the fungal enzymes for their removal, tests were also performed in the Jar Test. Analysis of the composition of HSs (characterization) and verification of degradation was performed by spectrophotometry in the ultraviolet and visible region, and infrared spectroscopy, by determining the enzyme production. The extraction method used was effective in the separation of humic and fulvic acids, the spectra of extracted humic acids showed carboxylic groups, alkyl, aromatic, alcohol, phenol and carbohydrates. The predominant enzyme in all fungal species used was laccase (Lcc); analyzed samples of *Trametes villosa* showed the largest decrease in absorbance at several wavelengths in the ultraviolet / visible (UV-Vis) spectra, an indirect measure of degradation. The samples containing the fungus *Trametes villosa* were also those that had a higher laccase enzyme production in most trials, reaching a production of 3.48 mL⁻¹ with humic acid from Sigma-Aldrich® brand and 2.61 U.mL⁻¹ for humic acid extracted and getting a percentage rate of removal of 56% and 42% respectively of these acids. In tests with fulvic acid and fungi at different pHs (3.0, 5.0 and 7.0), all has decreased range of UV/Vis with percentage removal rates of 92%. *T. villosa* showed the higher rates of adsorption evidenced by UV-Vis spectrum, albeit to a lesser extent than those treated with enzymes, their highest percentage of adsorption was 86%. Fungi in this study have great potential for degradation and adsorption of humic substances present in water.

Key Words: humic acid, fulvic acid, white decomposition by fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A): Estado da arte do conceito estrutural de um ácido húmico (A)-----	29
Figura 1 (B): Estrutura proposta de um ácido fúlvico (B)-----	29
Figura 2: Fluxograma da metodologia utilizada -----	61
Figura 3: Solo sendo tratado como solução de HCl a 0,5 mol/L para eliminação dos carbonatos e íons metálicos fracamente ligados, deixado em decantação (A), o conteúdo do Becker, contendo o solo foi transferido para um Becker de material plástico para receber tratamento com o líquido extrator, solução de NaOH 0,5 mol/L (B) e ao lado a mesma solução com NaOH a 0,5 mol/L, após 24 horas (C)-----	63
Figura 4: Solução no instante que recebeu o ácido HCl a 6 mol/L (A) e depois de 48 horas de decantação (B)-----	63
Figura 5 (A): Espectroscopia do ácido húmico extraído no espectrofotômetro de Infravermelho-----	65
Figura 5 (B): Espectroscopia do ácido húmico da Sigma-Aldrich® no espectrofotômetro de Infravermelho-----	66
Figura 5 (C): Espectroscopia do ácido fúlvico extraído no espectrofotômetro de Infravermelho-----	66
Figura 6: Espectro do ácido húmico extraído na região do Ultravioleta e visível-----	67
Figura 7: Determinação da atividade enzimática (U.mL ⁻¹) da Lacase de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em todas as amostras no 10º e 15º dia para os ensaios com ácido fúlvico-----	68
Figura 8: Determinação da atividade enzimática (U.mL ⁻¹) da Lignina peroxidase de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em todas as amostras no 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico-----	69
Figura 09: Determinação da atividade enzimática (U.mL ⁻¹) da Manganês peroxidase de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em todas as amostras no 15º dia para os ensaios com ácido fúlvico-----	70
Figura 10 (A): Determinação atividade enzimática (U.mL ⁻¹) da Lacase de <i>Trametes villosa</i> em todas as amostras no 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico-----	71
Figura 10 (B): Determinação das atividades enzimáticas (U.mL ⁻¹) da Lacase de <i>Trametes villosa</i> em todas as amostras do 15º dia para os ensaios com ácido fúlvico---	71
Figura 11: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL ⁻¹) da LiP de <i>Trametes villosa</i> em todas as amostras do 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico.-----	72

- Figura 12:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Lacase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10º e 15º dia nos ensaios com os ácidos húmicos-----75
- Figura 13:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Lignina Peroxidase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10º dia nos ensaios com os ácidos húmicos-----76
- Figura 14:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Manganês Peroxidase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10º dia nos ensaios com os ácidos húmicos -----76
- Figura 15:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Lacase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10º e 15º dia nos ensaios com os ácidos húmicos -----77
- Figura 16:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Lignina Peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10º dia nos ensaios com os ácidos húmicos -----78
- Figura 17:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da Manganês Peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10º dia nos ensaios com os ácidos húmicos -----78
- Figura 18:** Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico em pH 3,0 (A), pH 5,0 (B), pH 7,0 (C) no 15º, após os ensaios na Shaker -----80
- Figura 19:** Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico em pH 3,0 (A), pH 5,0 (B), pH 7,0 (C) no 15º, após os ensaios na incubadora agitadora Shaker-----80
- Figura 20:** Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído (A), *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico extraído (B), no 15º, após os ensaios na incubadora agitadora Shaker-----80
- Figura 21:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* para controle no 10º dia antes de colocar água destilada e autoclavada (A), com água autoclavada no 10º dia (B) e com água autoclavada no 15º(C) dia respectivamente-----82
- Figura 22:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* ainda sem o ácido fúlvico em pH 3,0 no 10º dia (A) com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10º dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 3,0 no 15º dia (C)-----83

Figura 23: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* ainda sem o ácido fúlvico em pH 5,0 no 10 ° dia (A) com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 5,0 no 15° dia (C)----84

Figura 24: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* ainda sem o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (A) o com ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 7,0 no 15° dia (C)----85

Figura 25: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* para controle sem água no 10 ° dia (A) com água autoclavada no 10 ° dia (B) com água autoclavada 15° dia (C)-----87

Figura 26: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 3,0 no 10 ° dia (A) com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 3,0 no 15° dia (C)-----88

Figura 27: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 5,0 no 10 ° dia (A) com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 5,0 no 15° dia (C)-----89

Figura 28: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (A) com ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 7,0 no 15° dia (C)-----90

Figura 29: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (A) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (B) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 15° dia (C)-----92

Figura 30: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido húmico extraído no 10 ° dia (A) com ácido húmico extraído no 10 ° dia (B) com ácido húmico extraído no 15° dia (C)-----93

Figura 31: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* ainda sem o ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (A) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (B) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 15° dia (C)-----94

Figura 32: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* ainda sem o ácido húmico extraído no 10 ° dia (A) com ácido húmico extraído no 10 ° dia (B) com ácido húmico extraído no 15° dia (C)-----95

- Figura 33:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----96
- Figura 34:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 3,0, no 10^o e 15^o dia respectivamente-----97
- Figura 35:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 5,0, no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----97
- Figura 36:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----98
- Figura 37:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o e 15^o dia respectivamente-----99
- Figura 38:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----99
- Figura 39:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----101
- Figura 40:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----101
- Figura 41:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido húmico extraído no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----102
- Figura 42:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido húmico da extraído no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente-----102
- Figura 43:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Pycnoporus sanguineus* de todas as amostras do 10^o dia e 24h nos testes com o ácido fúlvico-----103
- Figura 44:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Pycnoporus sanguineus* de todas as amostras do 10^o dia e 24h nos testes com o ácido húmico-----103

- Figura 45:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Trametes villosa* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido fúlvico-----104
- Figura 46:** Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Trametes villosa* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido húmico-----104
- Figura 47:** Fotografias da utilização do Jar Test contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico e *Pycnoporus sanguineus*; (A) os dois primeiros jarros são de *Trametes villosa*, e os dois últimos de *Pycnoporus sanguineus* (A) – fotografia da utilização do Jar Test (B) fotografias do final do uso do Jar Test (30 min. depois do início do experimento) o primeiro jarro com as amostras de *Trametes villosa* e o segundo com amostras contendo *Pycnoporus sanguineus*-----106
- Figura 48:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico no 10º dia, após a utilização do reator estático (Jar Test) (A), após 10 min. da finalização dos experimentos (B) e 24 horas após o finalização dos experimentos com o reator estático (Jar Test) (C)-----107
- Figura 49:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico no 10º dia (A), após a utilização do reator estático (B) e 24 horas após a utilização do reator estático (C)-----108
- Figura 50:** Fotografias dos experimentos em reator estático (Jar Test) contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico e *Pycnoporus sanguineus*; (A) os três primeiros jarros são de *Trametes villosa*, e os três últimos *Pycnoporus sanguineus* (A) – fotografia no momento do experimento, (B) fotografia do final do experimento em reator estático (Jar Test) (30 min. depois do início do ensaio) (C) fotografia comparando o primeiro jarro com as amostras de *Trametes villosa* e o segundo com amostras contendo *Pycnoporus sanguineus* no final do experimento em reator estático (Jar Test) (30 min. depois do início do experimento)-----109
- Figura 51:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído no 10º dia após experimento em reator estático (Jar Test) (A), 10 min. após o final do experimento (B) e 24 horas após o final do experimento (C) em Jar Test respectivamente-----110
- Figura 52:** Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico extraído no 10º dia após experimento em reator estático (Jar Test) (A), após 10 min. da finalização dos experimentos (B) e 24 horas após o final do experimento em reator estático (C) respectivamente-----111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Enzimas fúngicas estudadas-----	41
Quadro 2: Principais grupos de absorção no infravermelho para SHs-----	52
Quadro 3: Meios de Cultura -----	53
Quadro 4: Teste de Tukey para amostras das atividades enzimáticas de LiP por <i>Trametes villosa</i> no 10º dia-----	73

APÊNDICE A – LISTA DE QUADROS

Quadro A – 01: Atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido fúlvico -----	122
Quadro A – 02: Atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido fúlvico-----	124
Quadro A – 03: Atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico da Sigma-Aldrich®-----	126
Quadro A – 04: Atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico extraído-----	127
Quadro A – 05: Atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico da Sigma-Aldrich®-----	128
Quadro A – 06: Atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico extraído -----	129
Quadro A – 07: Análise de variância - Teste ANOVA da atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido fúlvico-----	130
Quadro A – 08: Análise de variância - Teste ANOVA da atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido fúlvico-----	131
Quadro A – 09: Análise de variância – Teste Tukey da atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido fúlvico-----	132
Quadro A – 10: Análise de variância – Teste T Pareado da atividade enzimática do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido fúlvico-----	132
Quadro A – 11: Análise de variância – Teste T Pareado da atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ácido fúlvico-----	132

Quadro A – 12: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido fúlvico no reator estático (Jar Test) -----	133
Quadro A – 13: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico no reator estático (Jar Test) -----	133
Quadro A – 14: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico nos ensaios no reator estático (Jar Test) -----	133
Quadro A – 15: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico Sigma-Aldrich® -----	134
Quadro A – 16: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico Extraído-----	134
Quadro A – 17: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido Húmico Sigma-Aldrich®-----	134
Quadro A – 18: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico extraído-----	134
Quadro A – 19: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico Sigma-Aldrich®-----	135
Quadro A – 20: Análise estatística descritiva de <i>Trametes villosa</i> com ácido húmico extraído -----	135
Quadro A – 21: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico Sigma-Aldrich®-----	135
Quadro A – 22: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico extraído-----	135
Quadro A – 23: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico Sigma-Aldrich®-----	136
Quadro A – 24: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico extraído-----	136
Quadro A – 25: Análise estatística descritiva de do <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido húmico Sigma-Aldrich®-----	136
Quadro A – 26: Análise estatística descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com ácido Húmico Extraído-----	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SHs	Substâncias húmicas
SHAs	Substâncias húmicas aquáticas
MON	Matéria orgânica natural
AHs	Ácidos Húmicos
AFs	Ácidos Fúlvicos
Lcc	Lacase
MnP	Manganês Peroxidase
LiP	Lignina Peroxidase
BGA	Batata, Glicose e Ágar
RPM	Rotação por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFG	Universidade Federal de Goiás
FF	Faculdade de Farmácia
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta e visível
COD	Carbono orgânico dissolvido
THM	Trihalometanos
DQO	Demanda Química de Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.1.1 Objetivos específicos	25
4 REVISÃO DE LITERATURA	26
4.1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	26
4.1.1 Composição das substâncias húmicas	27
4.1.2 Fracionamento das substâncias húmicas	30
4.1.3 Medidas indicadoras de substâncias húmicas na água	30
4.1.4 Extração e purificação das substâncias húmicas	32
4.1.5 Remoção de substâncias húmicas	33
4.1.6 Interação das substâncias húmicas com metais	34
4.1.7 Relação da cor nas águas de abastecimento e as substâncias húmicas	36
4.2 FUNGOS	38
4.2.1 Fungos Basidiomicetos	38
4.2.1.1 Sistemas enzimáticos encontrados em fungos basidiomicetos	40
4.2.1.1.1 <u>Enzima lignina peroxidase (LiPs)</u>	41
4.2.1.1.2 <u>Enzima manganês peroxidase (MnPs)</u>	42
4.2.1.1.3 <u>Enzima lacase</u>	43
4.2.1.2 Utilização de fungos de decomposição branca	44
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DA COLETA DAS AMOSTRAS	48
5.2 MÉTODO DE COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	48
5.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS	49
5.3.1 Extração dos ácidos húmicos e fúlvicos	49
5.3.2 Purificação em cromatografia de trocas iônicas utilizando colunas cromatográficas	49
5.3.2.1 Tratamento da resina de troca iônica na purificação dos ácidos húmicos	49
5.3.3 Teste de purificação do ácido húmico	50
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	50
5.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível	50
5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho	51

5.5 MICRORGANISMOS E PREPARO DO MEIO DE CULTURA-----	52
5.5.1 Meio de Cultura-----	53
5.5.2 Manutenção dos microrganismos-----	53
5.5.3 Cultivo em meio líquido-----	54
5.5.4 Adição dos ácidos húmicos da Sigma-Aldrich® e extraídos e dos ácidos fúlvicos na água -----	54
5.5.5 Teste de Adsorção-----	55
5.5.6 Uso do reator estático (Jar Test)-----	56
5.5.6.1 Preparação da Amostra para uso no reator estático (Jar Test)-----	56
5.5.6.2 Coleta para realização das análises enzimáticas e de espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis) e infravermelho-----	57
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	57
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	58
5.8 CÁLCULOS DOS ÍNDICES DOS PERCENTUAIS DE REMOÇÃO DOS ÁCIDOS E DE ADSORÇÃO-----	59
5.9 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES E MÉTODOS UTILIZADOS-----	61
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	62
6.1 EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS-----	62
6.1.1 Extração das substâncias húmicas-----	62
6.1.2 Purificação dos ácidos húmicos-----	64
6.1.3 Características das substâncias húmicas pelo exame no infravermelho e ultravioleta e visível-----	64
6.2 ANÁLISES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS-----	67
6.2.1 Resultado da atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> no ensaio com o ácido fúlvico na agitadora Shaker -----	68
6.2.2 Resultado da atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> no ensaio com o ácido fúlvico na agitadora Shaker -----	70
6.2.3 Teste de Tukey da avaliação da atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> na produção de LiP-----	73
6.2.4 Teste T Pareado da atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> e de <i>T. villosa</i> com Ácido Fúlvico-----	74

6.2.5 Resultado da produção enzimática por <i>Pycnoporus. sanguineus</i> e <i>Trametes villosa</i> na presença de ácido húmico adquirido da Sigma-Aldrich® e do ácido húmico extraído	75
6.2.6 O crescimento da massa fúngica	79
6.2.7 Resultados das análises com o espectrofotômetro ultravioleta e visível (UV-vis) para as amostras de <i>P. sanguineus</i> e <i>T. villosa</i> em presença de ácido fúlvico e sua correlação com a produção enzimática	81
6.2.8 Análises de ultravioleta e visível para as amostras de fungos em presença de ácido húmico e as correlações com a suas produções enzimáticas.	91
6.2.9 Teste de adsorção por <i>T. villosa</i> e <i>P. sanguineus</i> com o ácido fúlvico	95
6.2.10 Teste de adsorção por <i>P. sanguineus</i> e <i>T. villosa</i> com o ácido húmico da Sigma-Aldrich® e o ácido húmico extraído	100
6.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E UTILIZAÇÃO DO REATOR ESTÁTICO (JAR TEST)	102
6.3.1 Resultado da produção enzimática com a utilização do reator estático (Jar Test) das amostras de <i>P. Sanguineus</i> e <i>T. villosa</i>	102
6.3.2 Resultados de espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis) dos experimentos no reator estático (Jar Test)	105
7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	112
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE A- ATIVIDADE ENZIMÁTICA	121

1 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais existentes no mundo de hoje são extremamente preocupantes, desafiam a inteligência humana e ameaçam a existência terrestre. A água é um recurso ambiental renovável que vem sendo amplamente degradada e esgotada.

Isso ocorre devido à urbanização crescente e de forma desordenada o que agrava e compromete os recursos hídricos, trazendo danos aos sistemas públicos de tratamento já implantados promovendo a sua sobrecarga e gerando operações com deficiências (MIRANDA e TEIXEIRA, 2004).

Somente combinando pesquisas e estudos sobre tratamento de água e pré – tratamento, é que poderemos minimizar o comprometimento dos recursos hídricos como desenvolver medidas mitigadoras que poderão evitar a diminuição dos recursos hídricos como garantir o abastecimento e a qualidade da água tratada.

Conforme a resolução 357 – CONAMA, existem cinco classificações em ordem decrescente de qualidade da água. Considera-se ainda que este enquadramento esteja baseado não necessariamente no estado atual do corpo d'água, mas nos níveis de qualidade que deveriam possuir para atender às necessidades da comunidade. A Classe 2, diz respeito às águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, tratamento este que deve deixar a água própria para o consumo humano e promova a remoção da cor.

A cor que quando presente em águas brutas é geralmente ocasionada pela presença de substâncias húmicas (SHs). As Substâncias húmicas (SHs), matéria orgânica em diferentes estágios de degradação, são definidas como macromoléculas e formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente, representando os componentes mais estáveis da matéria orgânica. Suas propriedades de complexação, biodisponibilidade de metais, transporte, aumento da solubilidade e disponibilidade de nutrientes, alta capacidade de retenção de água, conservação do solo e interações com pesticidas desempenham importante papel nas propriedades químicas e físicas do solo e têm sido objeto de estudos (ROSALES et al., 1999; ROCHA et al., 2000; SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

As SHs possuem natureza heterogênea e complexa. Pouco se sabe sobre sua estrutura química e apresentam-se como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas com elevada massa molar. Possuem alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

Devido suas características estruturais as SHs podem interagir com metais e compostos orgânicos como, por exemplo, pesticidas presentes no ambiente. Para compreender o comportamento das SHs no ambiente, estas têm sido estudadas sob diferentes aspectos: caracterização de estruturas parciais, determinação de constantes de equilíbrio de espécies metal-SHs, acidez e labilidade relativa de metais (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

Entretanto, para trabalhar com SHs procedimentos adequados para extração e fracionamento são de fundamental importância. Fracionamentos baseados em diferenças de solubilidade, tamanho molecular, densidade de carga, precipitações com íons metálicos e características de adsorção são adequados para separar SHs em diferentes frações (ROCHA et al., 2000).

Estas SHs são as principais causas da cor na água, possuem características hidrofílicas e compreendem os ácidos húmicos e fúlvicos. Em termos de propriedades químicas e implicações para o tratamento de água, a fração da matéria orgânica designada como SHs é considerada mais importante (WIECHETECK, et al., 2004).

A importância da remoção das SHs se deve ao fato delas conferirem características indesejáveis à água distribuída, com possibilidade de formação de subprodutos da pré-oxidação e desinfecção, complexar-se com metais pesados e micropoluentes orgânicos e causar cor, ou podem ser associados à presença de compostos orgânicos em águas destinadas ao uso doméstico ou industrial. Estes compostos complexam-se facilmente com óxidos e interagem com argilo-minerais, ácidos graxos e pesticidas, promovendo sua solubilização. Por estarem envolvidos com o metabolismo e respiração celular, alteram significativamente o ambiente. Certos compostos orgânicos, quando presentes em águas de abastecimento, podem causar sabor e odor, e proporcionar condições para o desenvolvimento de microrganismos, prejudicando a qualidade bacteriológica da água distribuída (JULIO et al., 2006).

Quando compostos orgânicos não são removidos no tratamento de água, eles reagem com o cloro, que é adicionado na etapa de pré-desinfecção, gerando os compostos organoclorados que são extremamente prejudiciais à saúde. Novas

tecnologias e processos de tratamento para a remoção de matéria orgânica vêm sendo estudados, objetivando a redução ou eliminação de SHs e proporcionando maior biodegradabilidade das frações orgânicas (WIECHETECK, et al., 2004). Dentre estes estudos, os com microrganismos tem obtido papel de destaque, principalmente aqueles em que os microrganismos são fungos.

Os fungos exercem papel importante dentro do saneamento, pois atuam nos processos de transformação dos resíduos orgânicos, onde funcionam como recicladores de matéria nos diversos ecossistemas. O potencial fúngico para degradar polímeros tem sido amplamente estudado e em muitos casos aplicado para remoção de compostos de difícil degradação, podendo promover a degradação de compostos aromáticos, através de sistemas enzimáticos. E algumas espécies ainda podem ser utilizadas para degradar xenobióticos, deslignificar e descolorir (SAMPAIO et al., 2004).

As transformações da SHs ainda não são bem compreendidas na presença de microrganismos do solo. Estes microrganismos, como os fungos da podridão-branca, podem transformar as substâncias húmicas e até descolorir, modificando as propriedades dos ácidos húmicos (REZACOVA E GRYNDLER, 2006). Devido a estes fatores e que o tratamento de água com enzimas fúngicas bem como a extração e caracterização das SHs e o método de atuação destas enzimas fúngicas na remoção das substâncias húmicas na água será o enfoque dado a este trabalho.

2 JUSTIFICATIVA

Devido a enorme necessidade de sistemas de tratamento de água serem alto sustentáveis e que não gerem resíduos e que evitem a formação de subprodutos como também promovam a melhoria da água tratada apresentando potabilidade adequada e o mais importante com baixo custo operacional, foi que se pensou na utilização de enzimas fúngicas para a realização do estudo de remoção das substâncias húmicas, já que estas além de não gerarem resíduos são biodegradáveis e não formam compostos indesejáveis.

Os processos convencionais de tratamento de água podem apresentar limitações e inconvenientes, como a necessidade de grandes áreas de instalação e altos custos para implementação. Por isso, ao longo das últimas décadas, pesquisadores têm desenvolvido métodos e técnicas alternativas, como o tratamento com microrganismos, que usa o potencial biológico para o pré-tratamento da água. Esta técnica, se bem estudada, pode contribuir como tratamento alternativo ou complementar aos sistemas convencionais (físico-químicos).

As maiores vantagens dos sistemas biológicos são a portabilidade, o uso de pequenos espaços para a instalação, mas também apresenta desvantagens como necessidade de integrar esses sistemas a outros tratamentos convencionais.

Juntamente com essa necessidade de se conseguir técnicas de tratamentos de água alternativos, a remoção das substâncias húmicas também se faz necessária, mesmo sendo gerada de uma fonte natural. As substâncias húmicas são indesejáveis pelas seguintes razões: (1) elas são irritantes esteticamente; (2) elas podem facilmente formar complexos com metais pesados e poluentes orgânicos hidrofóbicos, tais como pesticidas, por causa de sua alta concentração de grupos funcionais ácidos e tamanho molecular grande, podendo alterar a toxicidade e potencial de bioacumulação desses poluentes; (3) podem formar compostos cancerígenos, como compostos orgânicos halogenados formados durante a cloração da água potável, como resultado de reações entre o material húmico e cloro (ZHOU E BANKS, 1993).

O abastecimento de água com a presença das substâncias húmicas, pode pôr em risco a vida das pessoas, pois estes não estão consumindo só o material orgânico de cor, mas também metais pesados e poluentes hidrofóbicos associados com compostos

húmicos. Sendo, portanto essencial que as substâncias húmicas sejam removidas da água antes da distribuição da água potável (ZHOU E BANKS, 1993).

A crescente demanda por tecnologias eficazes e econômicas para remoção de cor levou à investigação de um processo biológico, que utilizasse a capacidade de degradação e de adsorção do material biológico para a remoção das substâncias húmicas bem como de uma nova técnica no pré-tratamento de água.

O processo que ainda está sendo usado no tratamento da água para a remoção de ácidos húmicos e da cor que ele promove é a coagulação, que possui certas desvantagens. A quantidade de coagulantes utilizado é excessivo, o lodo resultantes em certas ETAs não tem um destino final adequado, a concentração elevada de alumínio em águas tratadas é também motivo de preocupação por causa de seus efeitos adversos à saúde, especialmente para crianças. Técnicas mais avançadas como adsorção com carbono ativado são de eficácia limitada na remoção de substâncias húmicas de água, além disso, o carvão ativado tem um custo muito alto de fabricação e também um custo altíssimo para ser regenerado (ZHOU E BANKS, 1993).

Um processo bastante utilizado para estas remoções são os processos biológicos, que são extremamente fundamentais, pois são métodos baratos e de fácil acesso. Os microrganismos responsáveis por este tratamento produzem enzimas que degradam substâncias, por isso tem se tornando um método cada vez mais viável. Apesar disso, antes de sua utilização, deve ser feito um estudo de viabilidade para cada situação, já que ainda não há um tratamento padrão que possa ser utilizado para a maioria dos casos.

O emprego de enzimas fúngicas na área de saneamento tem sido de fundamental importância, já que os fungos possuem vantagens se comparados aos sistemas químicos e físicos que requerem manutenção e mão de obra qualificada e de constantes reparos, além de ser um processo natural e que não gere nenhum subproduto poluente.

O enfoque dado a este trabalho é o tratamento de água por enzimas fúngicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir enzimas fenoloxidasas, peroxidases por fungos de decomposição, para serem utilizados na remoção e ou na degradação das substâncias húmicas, extraídas do solo, e adicionadas à água de estudo.

3.1.2 **Objetivos específicos:**

- Extrair, purificar ácidos húmicos e fúlvicos de amostras de solo de uma área do município de Goiânia – GO;
- Caracterizar os ácidos húmicos destas amostras de solo;
- Solubilizar os ácidos húmicos e fúlvicos em água para tratamento com fungos;
- Determinar enzimas fúngicas (peroxidases e fenoloxidasas) que são responsáveis pela degradação dos ácidos húmicos e fúlvicos;
- Verificar a viabilidade de tratamento (degradação) destas substâncias por meio das enzimas fúngicas;
- Verificar quais dos fungos utilizados no estudo são melhores produtores enzimáticos e melhor consegue remover os ácidos húmicos extraídos e adquiridos da Sigma-Aldrich® e o ácido fúlvico;
- Avaliar se houve adsorção fúngica dos ácidos húmicos e fúlvicos;
- Verificar a eficácia do tratamento com enzimas fúngicas na remoção dos ácidos em estudo com o uso de reator estático (Jar Test);

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A água para abastecimento humano requer tratamento, este por sua vez depende de fatores bióticos e abióticos que regem o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, que influenciam diretamente na qualidade do corpo d'água. Um composto que pode influenciar na qualidade das águas após tratamento é oriundo da degradação biológica do material orgânico tanto de origem vegetal ou animal depositado nos solos e nas águas que são conhecidas como SHs (SANTOS et al., 2008).

A matéria orgânica natural (MON) é formada por processos biológicos naturais e provém de reações químicas, biológicas e fotoquímicas, que ocorrem devido à presença de subprodutos da decomposição de animais e vegetais. Muitos constituintes da água natural constituem uma coleção de ácidos orgânicos polimerizados, chamados de substâncias húmicas, e outros tipos de compostos como ácidos carboxílicos, aminoácidos e carboidratos (TANGERINO E DI BERNARDO, 2002).

Em termos de propriedades químicas e implicações para o tratamento de água, a fração da MON designada como substância húmica é considerada mais importante (WIECHETECK et al., 2004). SHs são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

Nos últimos anos, o estudo da matéria orgânica do solo tem ganhado destaque devido à crescente preocupação existente com a qualidade do meio ambiente e que incentiva o estudo da matéria orgânica devido ao seu papel decisivo em diversos aspectos relacionados ao solo e à água (LOSS et al., 2006). Ela é naturalmente decomposta por processos bioquímicos e de biossíntese, envolvendo microrganismos diversos. Desta decomposição, resultam dois tipos de substâncias: substâncias não húmicas (proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, etc.) e as SHs que são divididas em ácidos húmicos (AHs), ácidos fúlvicos (AFs) e huminas (SIMÕES et al., 2006; MEDEIROS E BROCCHI, 2007).

A MON em sistemas aquáticos também é constituída principalmente por substâncias húmicas (SHs), que também são formadas através da decomposição microbiológica de resíduos de plantas e animais e de sua interação com argila e demais constituintes do solo, como também pela atividade biológica de algas e outros

microrganismos (TANGERINO E DI BERNARDO, 2005, ZÚÑIGA et al., 2006). As SHs representam a parte mais dinâmica e abundante da MON, apresentando na sua estrutura partes alifáticas e aromáticas que variam em função de diversas variáveis como origem, clima, etc. (ZÚÑIGA et al., 2006).

4.1.1 Composição das substâncias húmicas

A crescente demanda de consumo de água proveniente do abastecimento tem aumentado a procura por novas fontes de captação de água, próximos aos centros consumidores, em lagos ou represas de áreas degradadas que apresentam substâncias húmicas dissolvidas (SANTOS E MATSUMOTO, 2002).

A MON é amplamente distribuída nos solos, águas naturais e sedimentos. Mudanças hidrológicas e da composição do solo influenciam na quantidade de matéria orgânica em ambientes aquáticos e na sua natureza química, podendo provocar diferentes efeitos biogeoquímicos no ecossistema (AZEVEDO et al., 2006; AZEVEDO E NOZAKI, 2008). Assim, as características químicas da MON são influenciadas pela fonte do material (alóctones ou autóctones) e pelos processos biogeoquímicos envolvidos no ciclo do carbono nos sistemas terrestres e aquáticos (AZEVEDO et al., 2006).

Os ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina são as três frações principais do carbono orgânico total do solo, sendo a humina representada por cerca de 30 a 80%. Estas frações interagem com o material mineral, interferindo, assim, na dinâmica de nutrientes no sistema solo-planta, e exercendo um papel primordial na manutenção da fertilidade do solo (LOSS et al., 2006).

A humina é a fase sólida do solo enquanto que os ácidos são obtidos numa mistura líquida. Os ácidos fúlvicos e húmicos possuem grande quantidade de grupos funcionais, o que facilita a interação deles com o meio no qual estão inseridos (POLLI et al., 2008).

Assim, a caracterização de importantes propriedades físicas e químicas das SHs dissolvidas tais como solubilidade, comportamento de adsorção, acidez, capacidade complexante com íons metálicos, distribuição de grupos funcionais/estruturas reativas etc. pode ser feita em função da distribuição dos diferentes tamanhos moleculares (ROCHA et al., 2000).

As SHs são macro-moléculas complexas, constituídas de diferentes estruturas aromáticas e alifáticas, ricas em grupos funcionais, contendo oxigênio. Estas estruturas estão ligadas a peptídeos e a outros compostos contendo nitrogênio e carboidratos em pequenas quantidades (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

Devido à natureza heterogênea e complexa das SHs, pouco se sabe sobre sua estrutura química e apresentam-se como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas, constituídas de uma grande porção do carbono orgânico total presentes nos ambientes aquáticos e terrestres, definidas como macromoléculas com elevada massa molar e estruturas complexas e variadas (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001; MOREIRA et al., 2008).

As SHs são associações supramoleculares de moléculas heterogêneas relativamente pequenas. Este agregado não está associado por ligações covalentes, mas por interações mais fracas como as de Van der Waals e pontes de hidrogênio (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

Para compreender o comportamento das SHs no ambiente, estas têm sido estudadas sob diferentes aspectos: caracterização de estruturas parciais, determinação de constantes de equilíbrio de espécies metal-SH, acidez, labilidade relativa de metais, etc. (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

As SHs são moléculas grandes com diversos grupos funcionais, como carbonilas, carboxilas e outros, e se dividem em ácidos fúlvicos (solúvel), ácidos húmicos (solúvel, se $\text{pH} > 2$) e humina (insolúvel), sendo resultantes de reações químicas, fotoquímicas e microbiológicas que ocorrem durante a degradação da matéria vegetal e animal. As SHs têm sido usadas para representar os componentes orgânicos naturais presentes na água, em virtude de sua origem natural e de sua alta concentração na água. Elas apresentam características muito variáveis, mas em geral são compostas principalmente de carbono orgânico húmico, ácidos húmicos (figura 1 – A) ácidos fúlvicos (figura 1 – B) em porcentagens variáveis, dependendo do local de origem (TANGERINO E DI BERNARDO, 2005; MEDEIROS E BROCCHI, 2007).

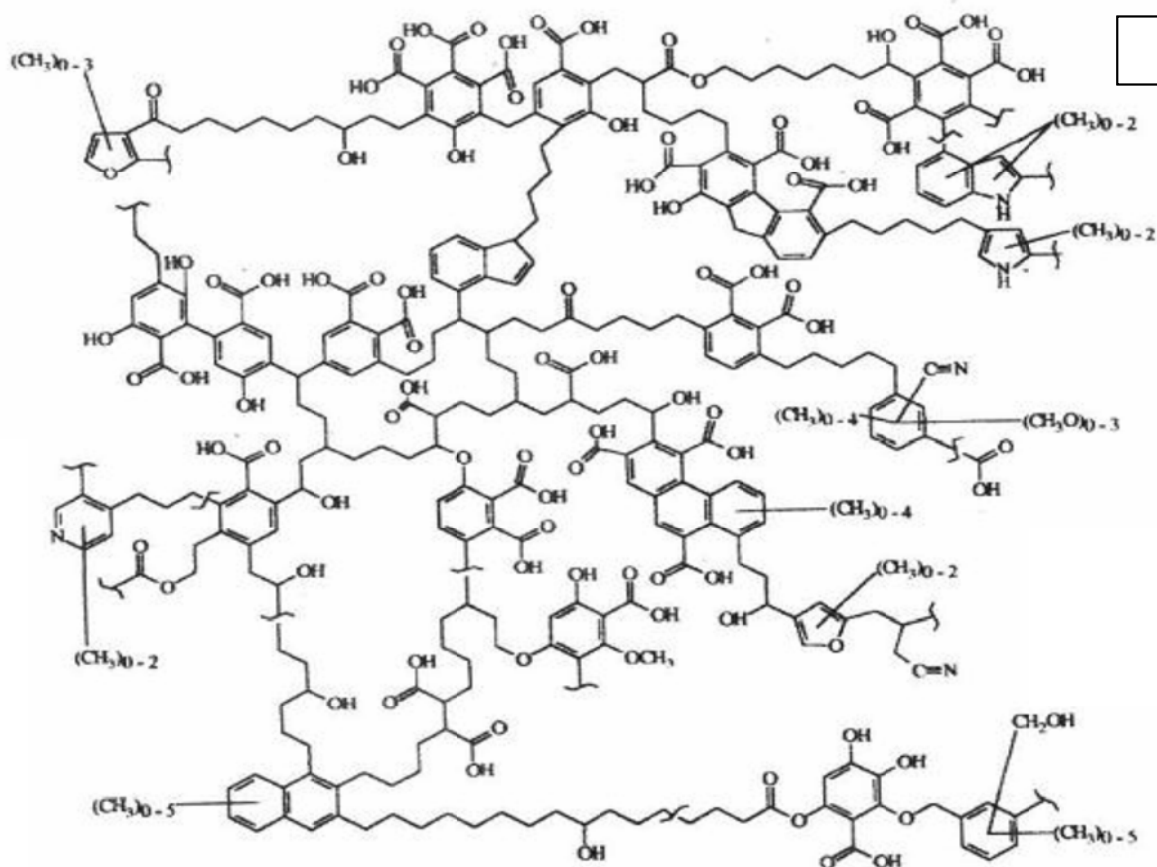


Figura 1 (A): Estado da arte do conceito estrutural de um ácido húmico (A) (BRUM, 2005).

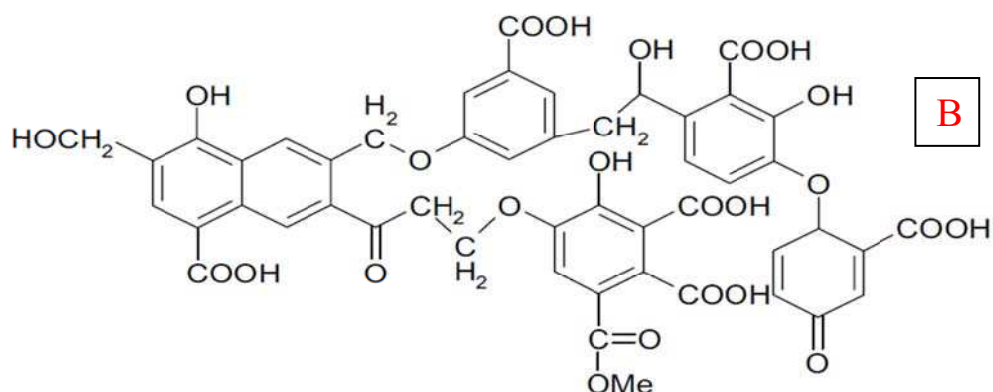


Figura 1 (B): Estrutura proposta de um ácido fúlvico (B) (STEFFEN, 2003).

As SHs interagem facilmente com espécies metálicas e algumas espécies de compostos orgânicos. Entretanto, essas interações são fortemente dependentes de suas características estruturais e dos tamanhos moleculares. Por isto, para trabalhar com SHs, procedimentos adequados para extração e fracionamento são de fundamental importância para o seu entendimento (MOREIRA et al., 2008).

4.1.2 Fracionamento das substâncias húmicas

A MON do solo constitui o maior reservatório de carbono da superfície terrestre. Este reservatório é dinâmico, podendo variar em decorrência de práticas de manejo. O fracionamento químico da MON do solo é normalmente utilizado para quantificar as frações húmicas do solo, sendo este um procedimento bastante conhecido (LOSS et al., 2006).

As frações das SHs como os ácidos fúlvicos (AFs) são originados, principalmente, pela associação de pequenas moléculas hidrofílicas que apresentam grupos funcionais ácidos, os quais mantêm seus constituintes solúveis em qualquer faixa de pH. Já os ácidos húmicos (AHs) são originados, principalmente, pela associação de compostos hidrofóbicos, que são estáveis em pH neutro devido às forças dispersivas hidrofóbicas. Com a diminuição do pH, ocorre aumento progressivo da estrutura molecular dos AHs, através das interações por pontes de hidrogênio, até ocorrer sua floculação em baixos valores de pH (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

O fracionamento químico da matéria orgânica com base na sua solubilidade em meio ácido e alcalino permite separar e quantificar estas frações, as quais posteriormente podem ser caracterizadas quanto à composição química (ANTUNES et al., 2007).

Quando as SHs são fracionadas, de acordo com sua massa molecular, diferenças na absorvância são observadas; em particular, frações de menor massa molar apresentam maior intensidade de fluorescência e menor absorvância que as frações de maior massa molar, sendo uma possível explicação para este fenômeno o fechamento da posição das subunidades hidrofóbicas, dentro do esqueleto estrutural da macromolécula, mascarados pelos grupos hidrofílicos (AZEVEDO et al., 2006).

4.1.3 Medidas indicadoras de substâncias húmicas na água

A concentração de carbono orgânico dissolvido na água, a capacidade de absorvância UV 254 nm e a potencialidade de formação de trihalometanos são medidas indiretas indicadoras da presença de substâncias húmicas na água (WIECHETECK et al., 2004). A caracterização analítica das substâncias húmicas baseia-se na distribuição do peso molecular aparente e na composição dos grupos carboxílicos e fenólicos (WIECHETECK et al., 2004).

As técnicas espectroscópicas de absorvância (UV-Vis) têm sido aplicadas, nas últimas décadas, para caracterizar, diferenciar e classificar a matéria orgânica natural (AZEVEDO E NOZAKI, 2008). Apesar de que os espectros de absorção das substâncias húmicas na região do ultravioleta e visível serem poucos característicos (PAULA, 1992).

Por sua estrutura complexa e variável, as SHs apresentam importante papel ambiental na biodisponibilidade de metais, no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas; na interação com compostos orgânicos antropogênicos; na cadeia alimentar planctônica, através da alteração da turbidez e da interação com nutrientes, modificando a produção primária; como fonte de carbono para a cadeia alimentar e, também, na alteração da zona fótica (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

Normalmente, as SHs em lagos são de origem terrestre, mas podem ser provenientes de plantas aquáticas da região litorânea (macrófitas aquáticas) ou do fitoplâncton. A principal diferença é a presença de lignina modificada existente nas SHs derivadas do solo, apresentando grande quantidade de anéis aromáticos e grupos contendo oxigênio. Já as SHs derivadas das algas apresentam maior quantidade de carbono alifático. Estas diferenças estruturais são as principais responsáveis pelas diferenças nas análises espectroscópicas na região do ultravioleta e visível e na emissão de fluorescência (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

As substâncias húmicas são constituídas por ácidos húmicos e fúlvicos que provêm da degradação química e biológica das plantas e resíduos animais, e da atividade de síntese microbiana, e representam uma fração importante da matéria orgânica natural (MON) dissolvida presente em ambientes aquáticos. A MON é constituída por 40% de ácidos fúlvicos, 10% de ácidos húmicos e 50% de produtos indefinidos dos quais 40% são ácidos hidrofílicos. A importância relativa da fração húmica está na estimativa da absorvância específica a UV 254 nm (SUVA), definida como a razão entre a absorvância ao UV 254 nm, em m^{-1} (que quantifica as substâncias húmicas), por unidade de carbono orgânico dissolvido (COD), em mg C/L (que quantifica a matéria orgânica dissolvida) (TEIXEIRA et al., 2001).

4.1.4 Extração e purificação das substâncias húmicas

A primeira etapa necessária para o estudo das substâncias húmicas é a sua extração. Vários fatores influenciam no procedimento de extração e muitas questões ainda estão por ser respondidas (ROSA et al., 2000).

Das condições experimentais utilizadas no procedimento de extração dependerão as futuras interpretações. Assim, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam extrair SHs de solos, com mínimas alterações nas estruturas originais, em tempo relativamente curto, elevado rendimento e baixo teor de contaminantes (ROSA et al., 2000).

Para a purificação das SHs usa-se a cromatografia de trocas iônicas. As razões que fazem da cromatografia de troca iônica uma técnica de separação eficiente são sua ampla aplicabilidade, seu alto poder de resolução, sua alta capacidade e a simplicidade e facilidade de controlar o método (LIMA, 2001).

Santos et al. (2008) utilizou para extração e purificação das SHs a resina Amberlite XAD-7 (Merck), de estrutura macromolecular não-iônica, sendo uma das técnicas mais empregada. É usualmente usada em condições isocráticas, onde as concentrações da solução permanecem constante.

Na literatura existem diversos procedimentos descritos sobre extração de SHs de solos. Entretanto, ainda não existe uma metodologia oficialmente adotada (ROSA et al., 2000; BOTERO et al., 2009). A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) tem recomendado para extração de SH de solos um procedimento padrão baseado em 4 horas de extração com solução de NaOH 0,1 mol/L à temperatura ambiente na razão solo/extrator 1:10 (m/v), sob atmosfera de nitrogênio (ROSA et al., 2000; BOTERO et al., 2009).

A maioria dos métodos de extração de SHs do solo se baseia em diferenças na solubilidade das mesmas em soluções ácidas ou alcalinas e posterior obtenção de três principais componentes: ácido húmico (FAH), que é solúvel em extrato alcalino, mas precipita-se sob acidificação; ácido fúlvico (FAF), que é a fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado, e humina (HUM) que é a fração que não pode ser extraída de solos e sedimentos por diluição ácida ou básica, ou seja, é o resíduo que sobra da separação das outras duas frações (LOSS et al., 2006).

Para melhor compreender o comportamento das SHs, estas têm sido estudadas sob diferentes aspectos: caracterização de estruturas parciais, determinação de

constantes de equilíbrio de espécies metal-SHs, labilidade relativa de metais etc. (ROSA et al., 2000).

Diferentes técnicas têm sido aplicadas para caracterizar, diferenciar e classificar a matéria orgânica natural, entre elas as SHs (AZEVEDO et al., 2006). Conseqüentemente, amostras extraídas por métodos diferentes geralmente não são comparáveis (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001). Como também por diferentes extratores. Alguns autores têm utilizado extratores brandos como pirofosfato de sódio, agentes complexantes, ácido fórmico, misturas ácidas e solventes orgânicos (ROSA et al., 2000).

4.1.5 Remoção de substâncias húmicas

A importância do estudo da remoção de MON, designadamente das substâncias húmicas, deve-se à sua presença na água poder afetar a qualidade desta de várias formas: cor indesejável, complexação com metais e produção de concentrações de metais que excedem a solubilidade normal, e reação com o cloro para produção de trihalometanos (THM), com implicações na saúde pública. As SHS são ainda agentes colmatantes das membranas de Ultra Filtração (TEIXEIRA et al., 2001).

Novas tecnologias e processos de tratamento para a remoção de MON vêm sendo estudados, objetivando a redução ou eliminação de substâncias húmicas e proporcionando maior biodegradabilidade das frações orgânicas (WIECHETECK et al., 2004).

A coagulação é o principal mecanismo de remoção de substâncias húmicas por neutralização de cargas e depende da dosagem de coagulante e do pH de coagulação (WIECHETECK et al., 2004).

A medida de remoção de substâncias húmicas é difícil de ser efetuada. É normalmente feita através de parâmetros substitutivos como cor verdadeira, absorvância 254 nm, COD, etc. (TANGERINO E DI BERNARDO, 2005). As Substâncias húmicas aquáticas (SHA) compreendem cerca de um terço até a metade do carbono orgânico dissolvido (COD) na água e são constituídas em sua maior parte por ácidos hidrofóbicos (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

4.1.6 Interação das substâncias húmicas com metais

O interesse tecnológico pelas SHs se justifica em função das propriedades destas substâncias tanto como agentes fertilizantes como por adsorverem substâncias tóxicas, como pesticidas e metais pesados, pois devido as suas características estruturais as SHs podem interagir com metais e compostos orgânicos presentes no ambiente. Por isso, estes compostos vêm sendo alvo de diversos estudos também no âmbito da Engenharia Ambiental (ROSA et al., 2000; MEDEIROS E BROCCHI, 2007).

Quando compostos orgânicos não são removidos no tratamento de água, eles reagem com o cloro, usualmente adicionado na etapa de desinfecção, gerando os compostos organoclorados que são extremamente prejudiciais à saúde (WIECHETECK et al., 2004). Podendo produzir trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) e uma variedade de outros subprodutos de desinfecção (SPD). Subprodutos estes que tem mostrado causar câncer de bexiga e do trato digestivo em animais de laboratório (CAMPOS et al., 2006).

SHAs com estruturas poliméricas e massa molar variável que contem à presença de radicais cetonas podem produzir halofórmios também conhecidos como trihalometanos que são substâncias cancerígenas, e são produzidos quando há a interação com compostos halogenados oriundos da pré-cloração da água (SANTOS et al., 2008).

A importância da remoção das SHs se deve ao fato de elas conferirem características indesejáveis à água distribuída, destacando-se, a possibilidade de formação de subprodutos da pré-oxidação e desinfecção, complexar-se com metais pesados e micropoluentes orgânicos e causar cor (JULIO et al., 2006).

Outros problemas ainda podem ser associados à presença de compostos orgânicos em águas destinadas ao uso doméstico ou industrial. Estes compostos complexam-se facilmente com óxidos e interagem com argilo-minerais, ácidos graxos e pesticidas, promovendo sua solubilização. Por estarem envolvidos com o metabolismo e respiração celular, alteram significativamente o ambiente. Certos compostos orgânicos, quando presentes em águas de abastecimento, podem causar sabor e odor, e proporcionar condições para o desenvolvimento de microrganismos, prejudicando a qualidade bacteriológica da água distribuída. Sua presença também tem sido relacionada com problemas de corrosão em sistemas de distribuição e interferem nos processos de desmineralização, proporcionando saturação acelerada das resinas trocadoras de íons ou

colmatação das membranas. As SHs são também fortemente adsorvidas em carvão ativado reduzindo seu tempo de vida e tornando-o sem utilidade para a remoção de poluentes (JULIO et al., 2006).

As SHs podem reagir com o ozônio e formar espécies radicalares em solução aquosa, como radicais hidroxilas (OH), aldeídos, cetoácidos e ácidos carboxílicos que contribuem para biodegradabilidade do carbono orgânico contido na água. Se a formação desses produtos de oxidação não for apropriadamente controlada pode levar à formação de biofilmes e o reaparecimento de microrganismos no sistema de distribuição de água (CAMPOS et al., 2006).

As SHs são formadas a partir da biodegradação de materiais orgânicos (animal e vegetal) no solo (POLLI et al., 2008). As SHs são formadas por compostos mais estáveis, de maior complexidade química e elevados pesos moleculares denominados fração ácidos húmicos (AH) e fração ácidos fúlvicos (AF) (ANTUNES et al., 2007). Podem ser divididas quanto ao seu grau de solubilidade frente a diferentes valores de pH em: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina (POLLI et al., 2008).

SHs estão presentes na água, solos e sedimentos e são de fundamental importância para o crescimento de plantas e para o controle bioquímico do carbono orgânico no ecossistema global (CAMPOS et al., 2007)

Dentre as várias pesquisas existentes duas teorias a respeito da estrutura das SHs se destacam; uma acredita que as SHs são formadas por macromoléculas enquanto a outra supõe que seriam formadas por pequenas e heterogêneas moléculas de várias origens que se auto-organizam em uma supramolecular conformação (CAMPOS et al., 2007).

As substâncias húmicas são caracterizadas pela sua solubilidade em água a um determinado pH. Os ácidos húmicos e os ácidos fúlvicos são polieletrólitos aniônicos com grau de ionização dependente do pH. Os autores relatam que pesquisadores realizaram uma titulação potenciométrica em soluções de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos e observaram dois pontos de inflexão, características dos grupos fenólicos (pH 8,0 a 8,2) e dos grupos carboxílicos (pH 4,6 a 4,9) (WIECHETECK et al., 2004).

As substâncias húmicas podem ser definidas operacionalmente de acordo com sua solubilidade em água. O ácido húmico (AH) é insolúvel em condições ácidas (pH < 2); o ácido fúlvico (AF) é solúvel em toda a faixa de pH e a humina é insolúvel em qualquer valor de pH. As SHs são de ocorrência natural (biogênicas), heterogêneas,

apresentam coloração escura, são refratárias e com elevada massa molecular (AZEVEDO E NOZAKI, 2008).

Substâncias húmicas são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente e devido à natureza heterogênea e complexa das SHs pouco se sabe sobre sua estrutura química e apresentam-se como moléculas polidifusas com elevada massa molar. Possuem alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas. Operacionalmente as SHs são fracionadas em função de sua solubilidade a diferentes valores de pH em: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos (AF) e humina (ROSA et al., 2000).

Quando as macromoléculas húmicas interagem com íons metálicos formam diferentes espécies, devido a rearranjos inter e/ou intramoleculares, o complexo metal-SHA tende a se estabilizar em função do tempo e, conseqüentemente, a labilidade relativa dos íons metálicos diminui. Assim, em águas com elevada concentração de matéria orgânica como as do Rio Negro, as substâncias húmicas aquáticas podem agir como “um tampão”, diminuindo a disponibilidade de íons metálicos para participar de outras reações no ambiente aquático (SARGENTINI JUNIOR et al., 2001).

4.1.7 Relação da cor nas águas de abastecimento e as substâncias húmicas

A MON em águas de abastecimento tem recebido a atenção de diversos pesquisadores desde a década de 70. A presença elevada de MON em mananciais para abastecimento público apresenta aspectos negativos, dentre os quais se podem citar: confere cor elevada à água bruta, dependendo dos compostos orgânicos presentes, pode causar odor e sabor, pode gerar subprodutos ao ser exposta a agentes oxidantes e desinfetantes, como, cloro, dióxido de cloro, ozônio, cloraminas, radiação ultravioleta, etc., que podem ser tóxicos, cancerígenos, mutagênicos ou teratogênicos e que em elevadas concentrações e longos períodos de exposição podem causar danos à saúde pública (TANGERINO E DI BERNARDO, 2005).

A presença de compostos proveniente da decomposição da matéria orgânica natural (MON) em águas superficiais agrupados em substâncias não húmicas e húmicas, é a principal causa da cor na água (WIECHETECK et al., 2004). As substâncias húmicas (SH) são as causadoras da cor amarela ou marrom das águas. Estas substâncias podem interagir fortemente com uma variedade de oxidantes e desinfetantes que são

usados para a purificação da água para consumo humano, particularmente o cloro (CAMPOS et al., 2006).

A cor das águas naturais é provocada em grande parte pela presença de compostos orgânicos de origem vegetal, decompostos pela atividade de microrganismos originando as SHs, como também pode ser devido à presença de metais como, ferro e manganês (CAMPOS et al., 2006; JULIO et al., 2006). De modo geral, pode-se dizer que as SHs são uma mistura heterogênea de substâncias de natureza química diversa, constituídas de ácidos amorfos, predominantemente aromáticos, hidrofílicos, com cadeias polieletrólíticas. Para os valores de pH comumente encontrados em águas naturais, as SHs apresentam carga superficial negativa e a cor de uma amostra depende do pH do meio, verificando-se uma diminuição da cor com aumento do pH (JULIO et al., 2006).

Para o estudo de remoção de cor, as SHs são amplamente empregadas para preparar águas de estudo. A justificativa em seu uso pode ser encontrada no fato de que cerca de 50 a 70% de todo carbono dissolvido em águas naturais não poluídas, seja devido a sua presença. As SHs empregadas em estudos podem ser originadas de diferentes matrizes (solo, turfa e aquática) o que torna essencial a determinação de algumas de suas principais características para que os resultados possam ser comparados com outros estudos (CAMPOS et al., 2000).

Quanto maior for a porcentagem de grupamentos contendo oxigênio, na estrutura das SHs empregadas para dar cor à água, maior será a dificuldade de sua remoção quanto menor a massa molecular das moléculas de substâncias húmicas, maiores foram as quantidades de ácidos fúlvicos e quanto maior foi a porcentagem de ácidos fúlvicos presente nas frações de SHs que causam cor a água, também maior foi a dificuldade de sua remoção. Estes resultados são importantes para melhorar o entendimento a respeito da remoção de cor de águas, o que hoje se torna muito relevante (CAMPOS et al., 2006).

4.2 FUNGOS

Os fungos vêm se mostrando hábeis em degradação de produtos tóxicos, sobrevivendo e crescendo em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes. Isto é possível porque os fungos produzem enzimas extracelulares oxidativas capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos de cadeia longa em compostos assimiláveis ao seu metabolismo, atividade que pode ser intensificada com a adição da glicose um substrato primário, de fácil assimilação, sendo os fungos filamentosos os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativas (FREITAS NETO et al., 2007).

Os fungos ainda apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. Eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (MOREIRA NETO, 2006).

O uso do tratamento biológico na água utilizando fungos têm por base a inoculação de microrganismos como fungos basidiomicetos que atuam sobre o substrato. Estes processos apresentam segurança do ponto de vista ambiental, principalmente por não utilizarem substâncias químicas durante o processo (SOUZA E ROSADO, 2009).

4.2.1 Fungos Basidiomicetos

Apesar de existirem formas físicas e químicas para o tratamento de água, os microrganismos têm sido intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do meio ambiente. Estudos indicam fungos basidiomicetos degradadores de lignina como eficientes na degradação de diversos compostos e de corantes, além do alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Estes fungos também conhecidos como fungos da podridão branca, atualmente estão sendo utilizados em tratamentos de biorremediação, na degradação de poluentes

ambientais recalcitrantes e em tratamentos de efluentes industriais (SOUZA E ROSADO, 2009).

Existem aproximadamente cerca de 25.000 espécies de fungos basidiomicetos. Estes são conhecidos popularmente por formarem corpos de frutificação, como cogumelos e orelha-de-pau. Sua fase vegetativa é chamada de micélio, formado por vários filamentos septados chamados de hifas. Estes fungos podem ser distinguidos por possuírem basídio, uma estrutura reprodutiva onde ocorre a meiose (SOUZA E ROSADO, 2009).

Os fungos basidiomicetos são classificados de acordo com as diferenças de padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em conta a característica macroscópica da degradação. Desta forma podem ser divididos em fungos de degradação ou podridão branca, podridão parda e podridão mole. Os fungos de podridão branca degradam três componentes principais da madeira: a celulose, a hemicelulose e a lignina, proporcionando coloração clara na sua degradação (SOUZA E ROSADO, 2009).

Há evidências de que nos basidiomicetos os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos e, portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos. A capacidade de degradação de diferentes classes de xenobióticos por basidiomicetos ligninolíticos está associada à natureza inespecífica do sistema enzimático ligninolítico e permite que até mesmo misturas complexas de poluentes sejam degradadas (MOREIRA NETO, 2006).

A degradação da lignina, de compostos recalcitrantes e de poluentes orgânicos por fungos da podridão branca como os basidiomicetos constitui um processo oxidativo, extracelular e relativamente inespecífico, sendo os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativa (MOREIRA NETO, 2006; FREITAS NETO et al., 2007). A degradação consiste em um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoredutases, representadas principalmente por lacases (Lcc), manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases (LiPs) e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular e outras peroxidases com ampla atuação, principalmente na atuação de degradação de compostos recalcitrantes. Os fungos diferem na habilidade de degradação destas substâncias,

devido às características individuais qualitativas e quantitativas de suas enzimas (MOREIRA NETO, 2006; SOUZA E ROSADO, 2009).

Estes fungos secretam enzimas que convertem polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas ocorre durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém-sintetizada (MOREIRA NETO, 2006; SOUZA E ROSADO, 2009).

Um fungo basidiomiceto ligninolítico seletivo intensamente estudado é o *Trametes versicolor*, que degrada a lignina não seletivamente. A lignina, constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares, é uma estrutura extremamente complexa. Na madeira, a lignina pode ser encontrada nas paredes primárias e secundárias das células, como também nos espaços intercelulares, sendo uma de suas funções a proteção a planta contra a degradação de suas paredes por microrganismos, função que se deve às características recalcitrantes, ou seja, de difícil biodegradação (SOUZA E ROSADO, 2009).

Estudos sobre a degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos fornecem informações para a aplicação destes fungos em inúmeras pesquisas envolvendo a biodegradação de diversos xenobióticos (SOUZA E ROSADO, 2009).

4.2.1.1 Sistemas enzimáticos encontrados em fungos basidiomicetos

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, constituídas por uma parte protéica, porém podem estar integradas a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Existe uma grande variedade de enzimas, sendo a maioria encontrada em pequenas quantidades. Algumas enzimas extracelulares são produzidas em grandes quantidades por certos organismos e são capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis, como celulose, proteínas e amido. Sua utilização é feita em processos biotecnológicos industriais, ajudando a reduzir a poluição do meio ambiente (SOUZA E ROSADO, 2009). As enzimas estudadas neste trabalho encontram-se resumidas no quadro 1, a seguir.

Quadro 1: Enzimas fúngicas estudadas

Enzimas	Catalizador	Atuação
Lacase	Oxigênio	Destoxificação de contaminantes fenólicos; Polimerizam lignosulfonatos de efluentes sulfito
Lignina peroxidase	Peróxido de hidrogênio	Promove reações de desaminação de ácidos aminoaromáticos; Degradação da lignina
Mangânes peroxidase	Peróxido de hidrogênio	degradação de xenobióticos recalcitrantes; peroxidação lipídica; Pro-oxidante

Estudos com estas enzimas ligninolíticas torna-se extremamente importante caracterizar as atividades ligninolíticas presente em determinadas condições de crescimento do fungo. Alguns parâmetros como: o pH ótimo de atividade e os limites em que ele se encontra; a temperatura ótima de atividade e estabilidade à temperatura, assim como, as propriedades cinéticas (K_m aparente) são fundamentais para se conhecer as condições ótimas de atuação destas enzimas (MOREIRA NETO, 2006).

4.2.1.1.1 Enzima lignina peroxidase (LiPs)

A descoberta desta enzima se deu em 1983, quando foi descrita como uma glicoproteína contendo ferro como grupo prostético, necessitando de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade. O H_2O_2 primeiramente oxida a enzima e o intermediário oxidado, retira um elétron, de núcleos aromáticos formando radicais aril, que se decompõem espontaneamente via reação de caráter radicalar (SOUZA E ROSADO, 2009).

Acredita-se que a LiPs pode ter sido formada durante a evolução dos fungos degradadores de lignina, promovendo reações de desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos, posteriormente o mecanismo extracelular, com a presença da LiPs, possibilitou a degradação da lignina (MOREIRA NETO, 2006).

Lignina peroxidase tem a capacidade de degradar diversos compostos fenólicos e não fenólicos, metoxiladas, que as demais enzimas como lacase e Mangânes peroxidase não são capazes de oxidar como também alcoóis benzílicos e dimetila, e provoca rearranjos intramoleculares. Avalia-se que o melhor pH para a remoção de fenóis desta enzima seja 4, sendo controlado preferencialmente pelo H_2O_2 (SOUZA E ROSADO, 2009).

Este tipo de enzima tem sido relatado em um grande número de fungos, como *Trametes versicolor*.

4.2.1.1.2 Enzima manganês peroxidase (MnPs)

A produção de manganês peroxidase é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos. Ainda não se evidenciou qualquer bactéria e levedura capaz de produzir esse tipo de enzima (MOREIRA NETO, 2006; SOUZA E ROSADO, 2009).

O peso molecular de MnPs varia de 38 a 62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas tem peso molecular próximo a 45 kDa (MOREIRA NETO, 2006).

Esta enzima é uma glicoproteína que atua com isoenzimas, oxidando diretamente Mn (II) a Mn (III), que atua como espécie ativa nos processos de oxidação catalítica; este é quelado por ácidos orgânicos como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução, porém a MnPs oxida somente estruturas fenólicas. A MnPs assemelha-se à LiPs pela presença do grupo heme, também dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade. Sua produção se dá juntamente com a LiPs durante o metabolismo secundário, porém a regulação é realizada pela concentração de carbono e nitrogênio do meio (SOUZA E ROSADO, 2009). Lembrando que o metabolismo primário é o período em que ocorre a degradação de fontes de carbono primárias, como os açúcares existentes no substrato degradado pelo fungo, já o metabolismo secundário ocorre após a diminuição de fontes de nutrientes primárias, sendo utilizadas o carbono dos polissacarídeos e da lignina como fonte de alimento (SOUZA E ROSADO, 2009).

A atuação de MnPs durante a peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, a avaliação da capacidade de culturas fúngicas para promover a peroxidação lipídica é de grande importância. O estímulo da peroxidação de ácidos graxos insaturados com concomitante produção de radicais lipídicos é reconhecido como atividade pro-oxidante (MOREIRA NETO, 2009).

A importância da MnPs na degradação da madeira se deve ao seu sistema enzimático, que gera espécies oxidantes pequenas e de fácil penetração. Por essas qualidades, estas iniciam a penetração na madeira, porém a característica de oxidação apenas de estruturas fenólicas limita sua capacidade de degradar integralmente lignina de alta massa molecular (SOUZA E ROSADO, 2009).

As enzimas peroxidases (LiPs e MnPs) são mais conhecidas pela capacidade de remoção de grupamentos fenólicos e amins aromáticas de soluções aquosas e também de descoloração de efluentes da indústria têxtil, tendo como pressuposto que muitos corantes empregados em indústrias têxteis possuem grupamentos fenólicos em sua estrutura química (SOUZA E ROSADO, 2009).

4.2.1.1.3 Enzima lacase

As lacases são glicoproteínas que contêm cobre no seu sítio ativo, constituindo um grupo de enzimas encontradas principalmente em fungos e plantas superiores (SOUZA E ROSADO, 2009). As reações de acoplamento oxidativo das lacases resultam na destoxificação de contaminantes fenólicos. Em meio líquido aerado, as lacases conseguem polimerizar lignosulfonatos de efluentes sulfito (MUNARI et al., 2003).

A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura onde atua a relação do carbono e nitrogênio, pH, temperatura e taxa de aeração (MOREIRA NETO, 2009).

Elas podem ser consideradas uma oxidase que catalisa reações de oxidação, na ausência de H_2O_2 , utilizando O_2 como oxidante, sendo reduzido a H_2O em um processo de oxidação, envolvendo quatro elétrons. As lacases são enzimas que não apresentam especificidade restrita quanto à estrutura do substrato, podendo catalisar a oxidação de várias estruturas aromática, como as fenólicas (mono, di e polifenóis). Alguns estudos recentes também mostram que a lacase também pode degradar compostos não fenólicos na presença de mediadores específicos (SOUZA E ROSADO, 2009).

Lacases e peroxidases oxidam uma ampla série de fenóis substituídos transformando radicais fenólicos em radicais aril-oxi, que se polimerizam espontaneamente e formam complexos insolúveis; estes podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (MUNARI et al., 2003).

A aplicação de lacases em sistemas de tratamento de efluentes pode ser de interesse, visto que apenas o oxigênio molecular é necessário como acceptor de elétrons para a reação enzimática (MUNARI et al., 2003). A lacase é uma polifenoloxidase produzida por diversos fungos, plantas e bactérias (BARBOSA E SANTIAGO, 2005).

O pH ótimo para a atividade das lacases depende do tipo de substrato utilizado. No caso dos fenóis, consideram-se pH ótimo quando contido no intervalo entre 3 e 7 para lacases fúngicas e 9 para lacases de plantas. A maioria das lacases isoladas atuam em zonas ácidas, com os valores ótimos variando entre 5 e 6 (SOUZA E ROSADO, 2009).

As Lccs fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais, devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, como a deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes e remediação de solos e águas contaminados (MOREIRA NETO, 2006). Estas também têm sido utilizadas em processos de branqueamento e despolpação para remoção de componentes fenólicos de efluentes, sucos de fruta, uva e vinho, devido ao seu potencial ligninolítico, sendo capazes de oxidar corantes azo fenólicos. A ação da lacase pode desintoxicar corantes azóicos, devido à sua reação que libera as ligações azo sob forma de nitrogênio molecular, não permitindo a formação de aminas aromáticas potencialmente carcinogênicas (SOUZA E ROSADO, 2009).

Experimentos de descoloração de efluentes alcalinos com lacase de fungos realizados por MUNARI et al., (2003) demonstraram que a atividade de lacase precede a descoloração de efluentes da indústria de papel por um pequeno período de tempo, resultado este que sustenta a hipótese do envolvimento da enzima com a perda de cor do efluente.

O *Trametes versicolor* têm sido intensamente estudados para processos de degradação de corantes. Caracterizam-se por serem bons produtores de lacases. A capacidade de catalisar reações de desmetilação é uma característica bastante promissora, uma vez que é o passo inicial para a biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento dos anéis aromáticos em estruturas fenólicas (SOUZA E ROSADO, 2009).

4.2.1.2 Utilização de fungos de decomposição branca

Desde a década de 90, a possibilidade de utilizar fungos da degradação branca para estratégias de biorremediação tem motivado muitas pesquisas de nível acadêmico, industrial e governamental. O interesse neste assunto provém da habilidade apresentada pelos fungos deste grupo em metabolizar uma grande diversidade de

poluentes muito persistentes ou tóxicos para o meio ambiente. Fungos de degradação branca são capazes de metabolizar uma variedade de poluentes xenobióticos, como bifenóis policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes industriais e pesticidas (MUNARI et al., 2003).

O início dos estudos sobre estes fungos em processos de biorremediação se deve à presença de seus complexos enzimáticos, capazes de degradar uma grande variedade de compostos (SOUZA E ROSADO, 2009). A vantagem na utilização de fungos da degradação branca no processo de tratamento de efluentes é de baixo custo, comparado com a utilização da enzima fenoloxidasas purificadas (MUNARI et al., 2003).

Fungos da decomposição branca são bastante conhecidos pelas habilidades de produzir enzimas extracelulares oxidativas que iniciam o processo de despolimerização ligninolítica. Esta capacidade permite a sua aplicação em uma série de processos biotecnológicos, baseados na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos (SOUZA E ROSADO, 2009).

O uso de fungos capazes de degradar compostos orgânicos parece ser um método bastante promissor para o tratamento de água quanto de resíduos, em particular, os fungos de decomposição branca que possuem um sistema enzimático capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (BARBOSA E SANTIAGO, 2005). Desta forma, os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade (MACEDO et al., 2002).

Estudos realizados com fungos basidiomicetes da podridão branca, visando à descoloração e degradação de efluentes têxteis, obtiveram resultados positivos. Observou-se a habilidade de degradação de poluentes recalcitrantes orgânicos como hidrocarbonetos, poliaromáticos, clorofenóis e bifenilas policlorados (SOUZA E ROSADO, 2009).

O sistema ligninolítico de alguns fungos são compostos de enzimas oxidativas não-específicas, as lacases e peroxidases, que apresentam potencial para aplicação na descoloração e desintoxificação de organopoluentes recalcitrantes (MUNARI et al., 2003).

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida, e a utilização de fungos ligninolíticos em bioprocessos envolvendo descontaminação ambiental, principalmente basidiomicetes degradadores

da podridão branca, vem crescendo grandemente nos últimos tempos, no que se refere à utilização de sistemas enzimáticos, devido às suas vantagens. Entre essas vantagens pode-se destacar a diminuição de compostos tóxicos durante o processo de descontaminação, uma vez que se trata de um processo natural, não necessitando de substâncias químicas e que podem ser utilizados em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos (MACEDO et al., 2002; SOUZA E ROSADO, 2009).

Vários estudos têm sido realizados com fungos com capacidade de degradar corantes têxteis. As principais vantagens da utilização de sistemas enzimáticos em vez de tratamentos convencionais em efluentes têxteis são a sua aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em altas e baixas concentrações de compostos tóxicos contaminantes, atuação em amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, fácil processo de controle, entre outros. A crescente utilização de enzimas em tratamento de poluentes específicos tem possibilitado a produção de enzimas mais baratas e facilmente disponíveis (SOUZA E ROSADO, 2009). Os fungos suportam grandes variações de pH, luz, umidade e oxigênio, além da grande capacidade de produção de enzimas extracelulares que atuam rompendo ligações químicas de moléculas grandes, transformando-as em moléculas menores fáceis de serem absorvidas e metabolizadas (SILVA et al., 2008).

Outro mecanismo que melhora a eficiência de remoção de compostos tóxicos por fungos é a aplicação deste com células imobilizadas. Pesquisas desenvolvidas com fungos e a utilização de reatores com biofilme aderido têm mostrado que esta configuração oferece grande eficiência e estabilidade, principalmente quando da necessidade de alta taxa de degradação (FREITAS NETO et al., 2007).

A vantagem de se trabalhar com tratamentos biológicos na remoção de produtos na água é relevante já que na remoção de efluentes o conteúdo pode ser altamente variável quanto às características químicas e físicas, o que torna o processo de tratamento biológico bastante restrito. Fungos como o *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* mostraram-se eficientes em processos de biodegradação e descoloração de efluentes têxteis, porém estudos complementares devem ser realizados para melhor entendimento da reação das enzimas ligninolíticas em compostos presentes em efluentes têxteis, bem como estudos de outros fungos degradadores da podridão branca, a fim de encontrar o organismo com maior adaptação e, conseqüentemente, maior produção de enzimas ligninolíticas capazes de degradar estes tipos de resíduo. Isto se deve à

fragilidade de produção de enzimas ligninolíticas, que necessitam de controle e manutenção das propriedades do meio de cultivo para o seu crescimento (SOUZA E ROSADO, 2009). Os fungos filamentosos são os mais eficientes na produção dessas enzimas. Podendo remover eficientemente a DQO (demanda química de oxigênio) de diversos efluentes (SILVA et al., 2008). Sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes (MACEDO et al., 2002).

Graças a essas habilidades têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais se destacam a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados - solo, águas superficiais e subterrânea (MACEDO et al., 2002).

Experimentos mostram que em incubações prolongadas com os fungos *Pycnoporus sanguineus* e o *Trametes versicolor* em geral, foi alcançado 70-80% de descoloração, índice cerca de 25% maior do que o alcançado com o melhor tratamento enzimático (48% de remoção em 72 h por lacase imobilizada) (MUNARI et al., 2003).

Os fungos, de um modo geral, promovem degradação de compostos aromáticos, através dos sistemas enzimáticos citocromo, monoxigenase e lignolítico. Algumas espécies fúngicas têm sido bastante empregada em xenobióticos para deslignificar e descolorir devido sua habilidade em produzir enzimas oxidativas extracelulares, que despolimerizam lignina (SAMPAIO et al., 2004; SANTOS et al., 2006).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento biológico de águas residuárias de refinarias de petróleo, os fungos vêm se mostrando hábeis em degradar efluentes tóxicos, sobrevivendo e crescendo em meios com concentrações elevadas de compostos recalcitrantes (FREITAS NETO et al., 2007).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental na Faculdade de Farmácia – UFG

5.1 CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DA COLETA DAS AMOSTRAS

A amostra de solo contendo as substâncias húmicas, foi coletada em um único ponto da cidade de Goiânia, no Sindicato dos funcionários da UFG localizado no campus samambaia/Sint-UFG a altura 689 m acima do nível do mar, com as coordenadas 16° 36' 33,7" latitude sul, 49° 16' 54,3" latitude oeste.

A área de coleta é uma região formada de brejo ou pântano. Internacionalmente, são conhecidos como “*wetlands*” (terras úmidas ou terras alagadiças). O terreno possui pouca inclinação, o que retarda o escoamento das águas. Encontrando-se na planície adjacente ao rio Meia Ponte, em uma região de depressão, recebendo as águas fluviais nos períodos de cheia.

5.2 MÉTODO DE COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram perfuradas três aberturas na área com 0,5 m² cada, onde foram coletados solos de uma profundidade a partir de 20 cm (figura 2), foi coletada uma alíquota de 1 kg de solo da área de cada abertura. Sendo três amostras de aberturas diferentes.

As amostras foram armazenadas em sacos de polietileno até a chegada ao Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental na Faculdade de Farmácia da UFG. O solo foi secado ao ar até que não houvesse nenhum indício de água no mesmo, foi desagregado com almofariz e passado em tamiz de malha 60. O restante foi armazenado em sacos de polietileno por 60 dias como fonte reserva caso ocorresse algum evento desfavorável durante o período de extração. Após o uso na extração dos ácidos o restante da amostra do solo foi descartado.

5.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS

5.3.1 Extração dos ácidos húmicos e fúlvicos

Foram pesados 300 g de solo em balança eletrônica semi-analítica com precisão de 0,1 g. Logo depois o solo foi reidratado com 200 mL de água destilada e deionizada, adicionando solução de 600 mL de HCl a 0,5 mol/L, para eliminação dos carbonatos e íons metálicos fracamente ligados.

Em seguida o solo foi lavado com água destilada e deionizada até atingir o pH neutro. Em seguida houve à extração do ácido húmico e do ácido fúlvico utilizando 600 mL de NaOH a 0,5 mol/L como líquido o extrator e após 24 horas o extrato alcalino dissolvido foi transferido para Becker de vidro onde foi acidificado com 600 ml HCL a 6 mol/L a pH 2,0, para que ocorresse a precipitação do ácido húmico e no sobrenadante ficasse o ácido fúlvico. Depois o ácido húmico e fúlvico foram redissolvido em NH_4OH até o pH chegar à neutralidade. Os ácidos foram separados manualmente, sendo que as interfases entre o ácido húmicos e fúlvicos foram descartadas e o restante dos ácidos reservados em fracos de vidros devidamente tampados e levados a geladeira a uma temperatura de 2 °C podendo variar até 3,9 °C. Depois de feitas as extrações das coletas das diferentes amostras, todas elas foram homogeneizadas

5.3.2 Purificação em cromatografia de trocas iônicas utilizando colunas cromatográficas

Para purificação do ácido húmico o mesmo foi eluído e inserido em colunas de vidro com resinas trocadoras de íons a Amberlite IR 120 que é uma resina catiônica adquiridas dos laboratórios Sigma-Aldrich® e Veteq. A Amberlite IR 120 apresenta capacidade de troca em volume de 2,2 meq/mL e de limite mínimo de 2,000 meq/mL, com características físicas de micropérolas amarelas. A cromatografia de trocas iônicas foi feita em colunas cromatográficas.

5.3.2.1 Tratamento da resina de troca iônica na purificação dos ácidos húmicos

Para ativação da IR 120 a mesma foi agitada por uma hora em ácido clorídrico 2 mol/L.

Para tratar a IR 120 a mesma foi lavada com NaOH a 1 mol/L sob agitação por uma hora e depois foi trocada a solução e aquecida até 50° C por mais uma hora, no final foi colocado 5 mL de água oxigenada (para 500 mL de resina).

Depois de lavada novamente com água destilada a resina foi deixada sob agitação por mais uma hora em ácido clorídrico a 2 mol/L, após esse procedimento foi lavada até pH quase neutro. A resina foi empacotada em colunas de vidro A resina foi utilizada até que se percebeu que parte dos grânulos da resina foram destruídos, quando a resina foi utilizada várias vezes e não apresentava o mesmo rendimento quanto ao inicialmente. Observando isso a resina foi descartada.

5.3.3 Teste de purificação do ácido húmico

O teste para verificação da pureza do ácido húmico que foi eluído nas colunas cromatográficas foi feito através da verificação do teor de cinzas e com teste com o reagente de nitrato de prata (AgNO_3) a 0,1 mol/L.

Logo após a cromatografia de trocas iônicas o ácido húmico e o fúlvico foram congelados. O ácido húmico purificado foi colocado em mufla a 500 °C por 2 horas para assim verificar o teor de cinzas como indicativo do grau de pureza do material em relação aos constituintes inorgânicos e ao processo de extração e purificação da amostra. A seguir foi feito o teste como o nitrato de prata para verificação do teor de metais do ácido húmico.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A análise da composição das substâncias húmicas (caracterização) foi realizada por espectroscopia na região do ultravioleta e visível utilizando um espectrofotômetro de varredura UV/Vis, e a espectroscopia na região do infravermelho, utilizando um espectroscópio de varredura de infravermelho.

5.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível

Foram feitas varreduras no espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 200 nm a 900 nm, para determinar as características tanto dos ácidos fúlvicos e

húmicos extraídos, e uma absorvância de 0 a 1. A varredura também foi utilizada para verificar se houve ou não degradação dos ácidos em estudo.

Também foi utilizada a razão entre as absorvâncias a 465 e 665 nm (usualmente referida como razão E4/E6) para fins de caracterização. Tal razão geralmente apresenta valores entre 3 e 5 para o ácido húmico e 6 a 8,5 para o ácido fúlvico (PAULA, 1992, ROSA et al., 2000) A razão E4/E6 está diretamente relacionada à condensação estrutural, sendo indicativo do grau de humificação, aromaticidade, peso molecular e conteúdo ácido das SH. Os valores diminuídos da razão E4/E6 indicam maior condensação enquanto que maiores razões estão associadas a estruturas menos condensadas (ROSA et al., 2000).

A espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-vis) utilizada nos experimentos das análises enzimáticas obedeceram a diferentes comprimentos de ondas, necessárias para cada experimento, descritas a seguir no item – Determinação enzimática.

Foi utilizado um espectrofotômetro da Marca Varian UV- visible, modelo Cary 50 Bio spectrophotometer do Laboratório LCQM (Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos) da Faculdade de Farmácia da UFG.

5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

As bandas de absorção geralmente são largas devido à sobreposição de absorções individuais. O espectro reflete a predominância de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como: COOH, OH, C=O no material húmico (PAULA, 1992).

O quadro 2, mostra os principais grupos de absorção no infravermelho para SHs segundo dados de Di Bernado et al. (2005) e que serão avaliadas neste trabalho.

Quadro 2- Principais grupos de absorção no infravermelho para SH

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições
3.395-3.400	Estiramento OH ligado e estiramento N-H
2.930	Estiramento CH alifático
1.705-1.716	Estiramento C=O de acetona e de ácidos COOH
1.630-1.650	Estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato COO ⁻ , estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O e deformação N-H das amidas primárias
1.510	Deformação N-H de amida secundária e estiramento C=C dos aminoácidos
1.450	Deformação C-H dos -CH ₂ e -CH ₃
1.420	Assimétrico C-O, deformação O-H e deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO ⁻
1.230	Estiramento simétrico C-O e deformação OH dos COOH
1.125	Estiramento C-O de alcoóis, éteres, ésteres e COOH
1.035	Estiramento C-O de polissacarídeos

Fonte: Di Bernado et al. (2005).

Os espectros infravermelhos foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System, com resolução de 4 cm⁻¹ na faixa de 4000-550 cm⁻¹, de 0 a 100% pela técnica de transmitância, o que necessariamente dispensa o uso da pastilha de KBr, já que as amostras estavam em meio líquido. O equipamento foi calibrado a uma frequência de 16 leituras simultâneas, para cada amostra lida. As análises foram feitas no Laboratório LCQM (Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos) da Faculdade de Farmácia da UFG.

5.5 MICRORGANISMOS E PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Os microrganismos utilizados nos experimentos foram fornecidos pela Fundação Tropical André Tosello, Campinas (SP) e fazem parte da coleção do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise da Faculdade de Farmácia – FF, da Universidade Federal de Goiás – UFG e correspondem as seguintes espécies: *Pycnoporus sanguineus* - PS (CCT - 4518), *Trametes villosa* – Tvi (CCT - 5567) pertencentes à ordem dos Polyporales e família Polyporaceae. Estas cepas foram as escolhidas por estarem disponíveis no Laboratório.

5.5.1 Meio de Cultura

O meio de cultura do tipo BGA (Batata, Glicose, Ágar) foi utilizado como meio para o desenvolvimento dos cultivados fúngicos para a manutenção das cepas, este sendo um meio sólido. Já o meio de cultura BGC (Batata, Glicose, Caldo) foi utilizado como meio para o desenvolvimento dos cultivados fúngicos dos experimentos, este sendo um meio líquido. Sendo dados de Melo e Sanhueza (1995) os componentes dos meios sólidos e líquidos encontram-se no quadro 3.

Quadro 3: Meios de Cultura

COMPONENTES	MEIO SÓLIDO	MEIO LÍQUIDO
Água destilada	Completar para 250 mL	Completar para 1000mL
Ágar	3,750g	Ausente
Caldo de Batata	50 mL	200 mL
Glicose	5g	20g
Recomendações	Esterilizar-se a 121° C durante 15 minutos	Esterilizar-se a 121° C durante 15 minutos.

Fonte: Melo e Sanhueza (1995).

O caldo de batata é obtido pelo cozimento de 1kg de batatas inglesas descascadas obtidas comercialmente em 1 L de água, por uma hora (Melo e Sanhueza, 1995).

5.5.2 Manutenção dos microrganismos

Para a manutenção das cepas de fungos em estudo foi utilizado o meio de cultura sólido, através do cultivado em placas de *Petri* e replicados trimestralmente.

Conforme metodologia proposta por Castellani (1967), o meio de cultura foi autoclavado em temperatura de 120°C por 20 min. e distribuídos em placas de *Petri* com volume de aproximadamente 15 a 20 mL por placa. Todos os procedimentos de inoculação aconteceram em capela de fluxo laminar, sendo inserido em cada placa um disco de inóculo do tamanho referente à abertura maior de uma ponteira de 1 mL de pipetador automático. Estes foram armazenados em estufa incubadora para BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) LS 334 – 300 L. Foi padronizado um período de

sete dias para o crescimento e desenvolvimento das cepas e posteriormente a retirada das placas de *Petri* da estufa incubadora para BOD e colocadas em geladeira a temperatura variando de -1 °C à -3° C.

5.5.3 Cultivo em meio líquido

Todos os procedimentos microbiológicos de inoculação no meio líquido como a adição dos ácidos húmicos e fúlvicos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar, a fim de manter as condições estéreis, de acordo com a metodologia apresentada por Castellani, 1967.

Após o crescimento dos fungos em meio sólido rico em BGA, foram retirados seis discos dos fungos, da placa de *Petri*, área conhecida como de crescimento ativo da colônia, discos cujo diâmetro corresponde ao tamanho da abertura maior de uma ponteira de 1 mL de um pipetador automático. Estes discos foram incubados durante 15 dias em frascos tipo erlenmeyers de 250 mL, a 28°C em condições de agitação a 140 RPM, em crescimento em escuro. O conteúdo de cada erlenmeyers foi de 25 mL de BGA e 25 mL de água deionizada, destilada e autoclavada para manter as condições estéreis do meio.

A adição de água deionizada, destilada e autoclavada foi necessária para que não houvesse interferência nas análises de espectrofotometria de infravermelho, já que uma maior quantidade de meio de cultura poderia interferir nos resultados e na leitura das bandas pelo espectrofotômetro.

5.5.4 Adição dos ácidos húmicos da Sigma-Aldrich® e extraídos e dos ácidos fúlvicos na água

No 10º dia houve a adição de 1g de ácido húmico extraído dissolvido em água destilada e deionizada e autoclavada completando um volume de 50 mL, nos erlenmeyers. Também foram feitos ensaios com o ácido húmico comprado do laboratório da Sigma-Aldrich® a afim de comparação com o ácido húmico extraído. A solução com o ácido húmico do laboratório Sigma-Aldrich® foi produzida a partir de um 0,2g, sendo dissolvido em água destilada deionizada e autoclavada até formar uma solução de 50 mL, optou-se por esta concentração menor já que o ácido húmico adquirido do Laboratório Sigma-Aldrich® estava em pó, liofilizado e com um grau de

pureza e concentração maior, pois a empresa segue normas na produção e venda do ácido.

Para os ensaios feitos com o ácido fúlvico foi adicionado o ácido sem dissolução, já o ácido fúlvico extraído foi utilizado em solução aquosa. Foram adicionados 50 mL de ácido fúlvico nos erlenmeyers. Para fins de experimentação o ácido fúlvico teve seu pH controlado durante os ensaios. Os ácidos fúlvicos adicionados tiveram pH 3, pH 5 e pH 7. O tratamento foi determinado pela mesma metodologia de caracterização, ou seja, os espectros antes deste tratamento foram comparado com os espectros das substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos) após a atuação das enzimas fúngicas.

A incubação para a produção das enzimas aconteceu sob agitação de 140 RPM e temperatura de 28°C, por 15 dias, sendo que no 10º e 15º dia foram analisadas amostras para a determinação da lacase (fenoloxidades) e peroxidases.

Para padronização dos experimentos em meio líquido adotou-se: (1) realização dos ensaios em triplicatas, (2) retirada de 5 ml de alíquotas, no 10º e 15º dias para a dosagem enzimática; perfazendo um total de 2 coletas, (3) as dosagem enzimáticas foram realizadas em duplicatas, (4) também foram coletadas e separadas no 10º dia, amostras sem os ácidos e com a presença do ácidos e no 15º dia, para análise de varredura nos espectros de ultravioleta e visível (UV- vis). Estas amostras devidamente identificadas, foram mantidas sob condição de congelamento em frasco âmbar do tipo criogênico.

5.5.5 Teste de adsorção

O Teste de adsorção tem como princípio verificar se houve ou não a adsorção pelos micélios fúngicos dos ácidos em estudo. O Teste de Adsorção é realizado como uma análise complementar as análises de atividade enzimática.

O procedimento para o Teste de adsorção são os mesmos utilizados para o cultivo em meio líquido, mudando apenas o procedimento no 10º dia, momento em que os erlemneys são levados a autoclave. A autoclave mata os fungos e assim não ocorrerá produção de enzimas pelo fungo.

Os procedimentos de coleta das amostras são os mesmos utilizados nas análises anteriormente citadas.

5.5.6 Uso do reator estático (Jar Test)

As amostras contendo os fungos em crescimento foram levadas para a utilização do reator estático (Jar Test) na ETA Jaime Câmara - Sistema Produtor João Leite no município de Goiânia localizada no setor Negrão de Lima, os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Operacional sob a supervisão das Biólogas, Luciana de Souza Melo Machado, coordenadora da Produção de Água Tratada - ETA Jaime Câmara na Companhia de Saneamento de Goiás S/A – SANEAGO e da Wilma Gomes da Silva Carmo, Técnica Industrial em Saneamento na Supervisão do Sistema Produtor João Leite na Companhia de Saneamento de Goiás S/A –SANEAGO.

5.5.6.1 Preparação da Amostra para uso no reator estático (Jar Test)

Foram preparados 200 mL de caldo BGC puro e colocados nos erlenmeyers, onde foram adicionados 48 discos de fungos provenientes das placas de *Petri* (tudo proporcional aos ensaios anteriormente realizados em meio agitado). As inoculações aconteceram nas mesmas condições anteriormente citadas; na capela de fluxo laminar e autoclavadas para manutenção estéril do conteúdo de cada erlenmeyer,

Depois estes foram deixados sobre agitação durante 10 dias na incubadora Shaker a 28° a 140 RPM. No 10° dia as amostras contendo os fungos em crescimento foram levadas para a realização dos ensaios do Jar Test na ETA Jaime Câmara.

Foram feitos dois testes, um com ácido húmico extraído e o outro com ácido fúlvico em dias alternados, por isso a inoculação dos fungos aconteceu em dias diferentes para que os ensaios fossem necessariamente feitos no 10° dia do crescimento do fungo. Em todos foram utilizados os seis jarros de 2 Litros em reator estático (Jar Test), marca Nova ética, modelo 218 LDB, onde foram colocados 200 mL de água destilada, 200 mL do conteúdo dos erlenmeyers contendo o caldo com o fungo em crescimento.

Em seguida foi adicionado ao mesmo instante em cada jarro 400 mL do ácido em estudo, sendo que durante o ensaio do ácido húmico foram dissolvidos 8g de ácido extraído e purificado e completado o volume de 400 mL e no ensaio com o ácido fúlvico foram utilizados 400 mL do ácido em solução.

No reator estático (Jar Test) a solução obtida foi colocada sobre agitação constante de 140 RPM durante 20 min. e deixado sobre decantação por um período 10

min. e por mais 24h. O mesmo procedimento foi feito com o ácido fúlvico que foi adicionado em solução com as mesmas proporções em pH 4,0. A temperatura e o pH foi monitorada antes e após o término do ensaio.

5.5.6.2 Coleta para realização das Análises enzimáticas e de Espectrofotometria de ultravioleta e visível (UV-vis) e infravermelho

Foram retiradas 6 mL de alíquotas para análises no 10º dia depois da solução feita entre caldo com fungo e a água destilada e depois de 10 min. de decantação depois do ensaio, como modelo do procedimento realizado nos ensaios padronizados da ETA com o uso de coagulantes e depois de 24 horas do início do ensaio no Jar Test, .

Durante a Análise das atividades enzimáticas, o grau de diluição do material levado para as análises foram consideradas, as amostras de 24 horas e de 10 min. do fim do ensaio foram calculadas conforme o grau de diluição.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

A atividade enzimática da lacase (Lcc) foi determinada através da oxidação da seringaldazina ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Sendo conduzida numa mistura de reação que continha 0,6 ml do extrato bruto do caldo de fungos, 0,2 ml do tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 5,0) e 0,1 ml de seringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparada em etanol. A reação é iniciada pela adição da seringaldazina e a velocidade desta reação foi acompanhada por 10 minutos. As leituras da atividade enzimática foram realizadas em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto em 1 mL de mistura de reação (SZLARZ et al., 1989).

Para manganês peroxidase (MnP) os componentes da mistura foram: 0,5mL do extrato bruto do caldo de fungos, 0,1 mL de lactato de sódio, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO_4 $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$, 0,05 mL de solução de H_2O_2 , $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em tampão de succinato de sódio $0,2 \text{ molL}^{-1}$ e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada por 5 minutos a 30°C em banho-maria e a reação interrompida pela adição de $40 \mu\text{L}$ de NaOH $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$. A leitura da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro e é determinada pela oxidação do

vermelho de fenol. A absorbância para leitura foi 610nm e a atividade de MnP expressa como $\Delta\text{Abs}/\text{mL}\cdot\text{min}$. (KUWAHARA et al., 1984).

A atividade enzimática de lignina peroxidase, onde os componentes para a mistura da reação foram: 0,6 do extrato bruto do caldo de fungos, 0,2 mL de H_2O_2 , 2,0 mmolL^{-1} de solução de álcool veratrílico ($\epsilon_{310\text{nm}} = 93000 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 2,0 mmolL^{-1} em tampão de tartarato de sódio 0,4 molL^{-1} (pH 3,0). A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 e a leitura foi feita a partir do aldeído formado dessa reação medindo a 310 nm. A atividade de LiP é expressa em U/mL Uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto em 1 mL de mistura de reação. (TIEN e KIRK, 1984 – modificado).

Para determinação do cálculo enzimático utilizou-se a equação conforme a metodologia de Leonowick e Grzywnowick, (1881).

A atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$U = 10^6 \times \Delta E / \epsilon \times R \times \Delta t$$

Onde:

ϵ : coeficiente de extinção molar de cada substrato, conforme dados da literatura;

ΔE : Absorbância em comprimento de onda específico;

Δt : Tempo de reação em minutos;

R: Quantidade de caldo enzimático em mL;

Uma unidade U é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. O resultado é expresso em U. mL^{-1} .

5. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das atividades enzimáticas obtidos nos experimentos foram tratados estatisticamente. O programa Microsoft® Excel 2007 foi utilizado para tabulação dos dados e a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS® for Windows®, versão 15.0.

Para comparação das atividades enzimáticas do *Pycnoporus sanguineus* e atividades enzimáticas do *Trametes villosa* foram utilizados o Teste ANOVA e para confirmação da significância o Teste Tukey.

O Teste ANOVA compara grupos que possuem distribuição normal, e mostra o grau de significância da amostra. Então se p for $<0,05$ ele é significativo se p

for $>0,05$ não possui significância estatística. O Nível de significância é de 5% ($p<0,05$).

O Teste Tukey, foi utilizado para comparar o intervalo das atividades enzimáticas dois a dois para confirmação da significância. O Teste Tukey é um dos testes de comparação de média mais utilizados, por ser bastante rigoroso e de fácil aplicação, mas não permite comparar grupos de tratamentos entre si, sendo utilizado para testar toda e qualquer diferença entre duas médias de tratamento e é aplicado quando o teste para ANOVA for significativo ou seja p menor que 0,05.

Teste T Pareado foi utilizado para comparar os dois grupos no mesmo momento (se mede uma variável antes e depois de um evento).

5.8 CÁLCULOS DOS ÍNDICES DOS PERCENTUAIS DE REMOÇÃO DOS ÁCIDOS E DE ADSORÇÃO

O índice de remoção dos ácidos em incubadora Shaker:

- 1) Foi medido à distância do espectro obtido em todos os eixos da solução em estudo no 10º sem ácido;
- 2) Foi medido à distância do espectro obtido em todos os eixos da solução em estudo no 10º com o ácido;
- 3) Foi medido à distância do espectro obtido em todos os eixos da solução em estudo no 15º com o ácido;

Depois foram feitos os cálculos onde foram obtidos os índices de remoção.

Os índices foram calculados através dos espectros do 15º dia de estudo em presença dos ácidos considerando como índice de remoção. Quanto maior o índice de remoção encontrado os espectros foram iguais às soluções apresentadas no 10º dia sem a presença dos ácidos em estudos, já quanto menor for o índice de remoção mais o espectro do 15º se aproximou do espectro apresentando no 10º dia quando a solução recebeu o ácido. Sendo então o ponto máximo de remoção quanto mais o espectro foi se aproximando ao espectro do 10º dia sem o ácido e o ponto mínimo de remoção quanto mais os espectros foram aproximados dos espectros do 10º dia em presença dos ácidos.

Para o cálculo do índice do percentual de adsorção dos espectros obtidos nos ensaios na incubadora Shaker com os ácidos em estudo, foi utilizada a fórmula:

$$E^2 - E^1 = R^1$$

$$E^3 - E^1 = R^2$$

$$(100 : R^1) \times R^2 = R^3$$

$$R^3 - 100\% = \text{In}\%$$

Onde:

E^1 = Espectro do 10º dia da solução sem o ácido em estudo;

E^2 = Espectro do 10º dia da solução com o ácido em estudo;

E^3 = Espectro do 15º dia da solução com o ácido em estudo;

R^1 = Resultado 1 (diferença entre o espectro do 10º dia da solução com o ácido em estudo e o espectro do 10º dia da solução sem o ácido em estudo);

R^2 = Resultado 2 (diferença entre o espectro do 15º dia da solução com o ácido em estudo e o espectro do 10º dia da solução sem o ácido em estudo);

R^3 = Resultado 3;

$\text{In}\%$ = porcentagem do índice de remoção.

Para o cálculo do índice do percentual de adsorção nos espectros obtidos nos ensaios na incubadora Shaker com os ácidos em estudo, foi utilizada a fórmula:

$$(100 : E^1) \times E^2 = R^1$$

$$R^1 - 100\% = \text{In}\%$$

Onde:

E^1 = Espectro de adsorção do 10º dia da solução com o ácido em estudo;

E^2 = Espectro do 15º dia da solução com o ácido em estudo;

R^1 = Resultado 1;

R^2 = Resultado 2;

$\text{In}\%$ = Porcentagem do índice de remoção.

Para o cálculo do índice de percentual de remoção dos ácidos em estudo nos experimentos em reator estático foram utilizadas as fórmulas:

$$E^1 : 100 = R^1$$

$$R^1 \times E^2 = R^2$$

$$(100\% - R^2) = \text{In}^1\%$$

$$E^1 : 100 = R^1$$

$$R^1 \times E^3 = R^3$$

$$(100\% - R^3) = \text{In}^2\%$$

Onde:

E^1 = Espectro do final do experimento em reator estático;

E^2 = Espectro 10 min. depois do final do experimento em reator estático;

E^3 = Espectro 24 horas depois do final do experimento em reator estático;

R^1 = Resultado 1;

R^2 = Resultado 2;

$In^{1\%}$ = Porcentagem de índice de remoção após 10 min. da finalização dos experimentos;

$In^{2\%}$ = Porcentagem de índice de remoção após 24 horas da finalização dos experimentos.

Em todos os cálculos dos índices de percentuais de remoção e de adsorção forma utilizados duas análises para facilitar o cálculo dos índices. A análise do primeiro trecho que corresponde a média dos espectros de 200 a 400 nm e do segundo trecho que corresponde a média dos espectros de 400 a 800 nm.

5.8 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES E MÉTODOS UTILIZADOS

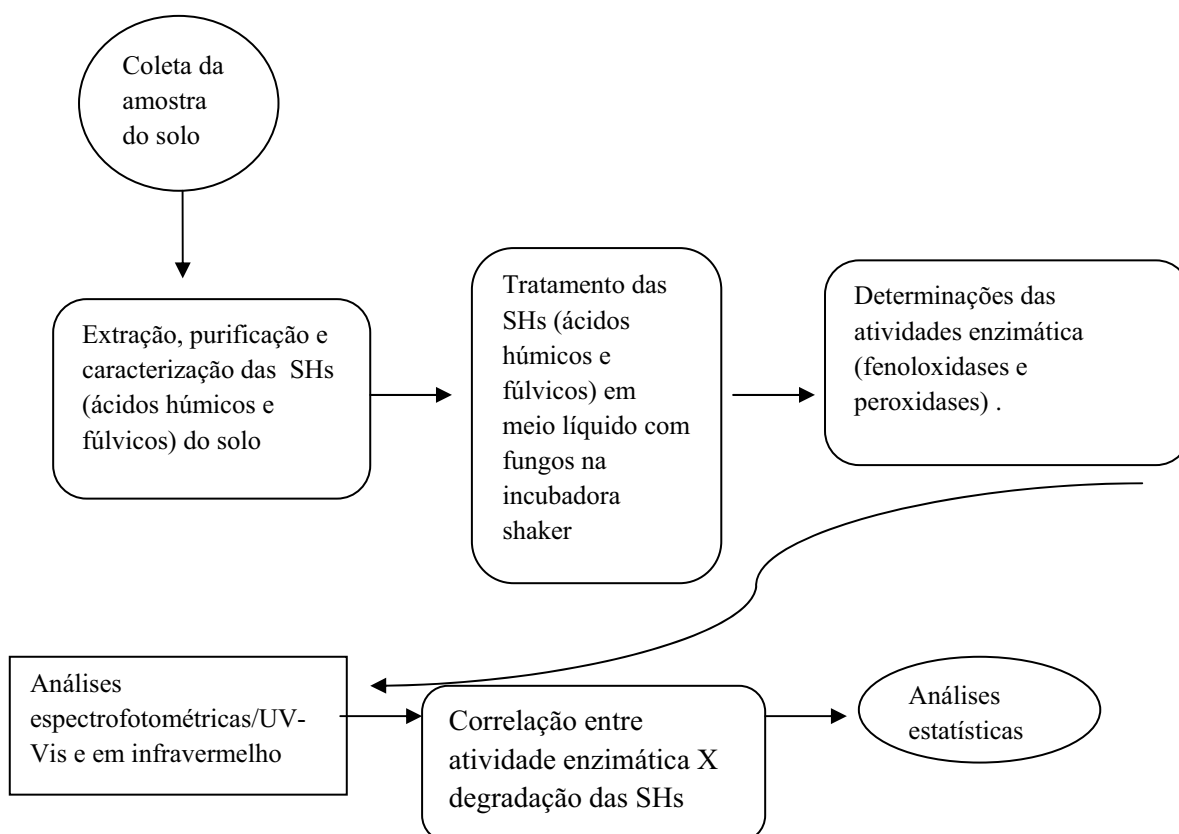


Figura 2: Fluxograma das atividades e dos métodos realizados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi dividido em 5 partes:

- 1) Extração das substâncias húmicas, purificação e caracterização dos ácidos húmicos;
- 2) Análises das atividades enzimáticas;
- 3) Crescimento da massa fúngica;
- 4) Redução das substâncias húmicas por enzimas;
- 5) Uso do reator estático (Jar Test).

6.1 EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS.

6.1.1 Extração das substâncias húmicas

As porções das substâncias húmicas extraídas foram satisfatórias, apresentando bons resultados na composição da matéria orgânica extraída.

A figura 3 (A) mostra o solo sendo tratado com a solução de HCl a 0,5 mol/L para eliminação dos carbonatos e íons metálicos fracamente ligados, deixado em decantação.

A figura 3 (B) mostra quando o conteúdo do Becker foi transferido para um Becker de material plástico para receber tratamento com o líquido extrator (solução de NaOH 0,5 mol/L) e ao lado a figura 3 (C) mostra o líquido extrator depois de 24 horas.

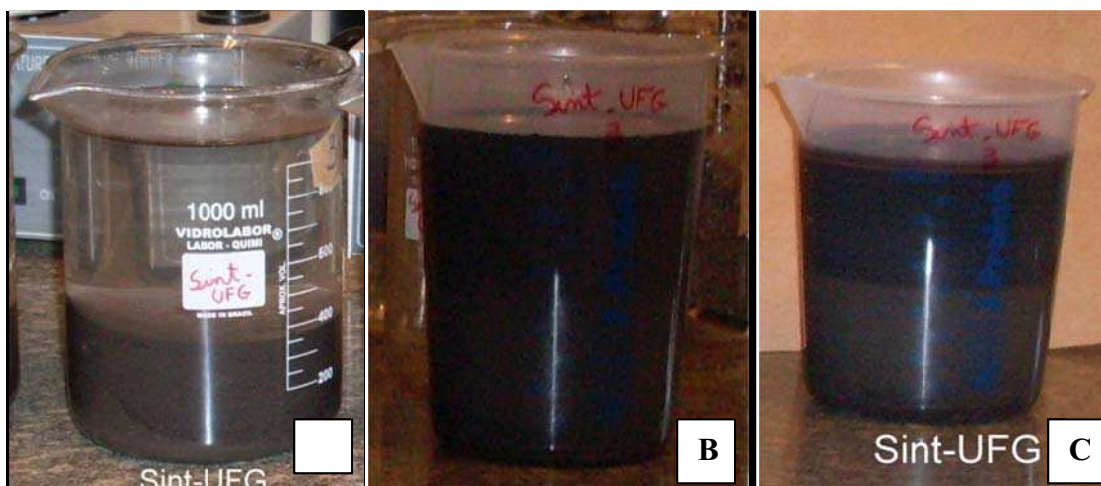


Figura 3: Solo sendo tratado como solução de HCl a 0,5 mol/L para eliminação dos carbonatos e íons metálicos fracamente ligados, deixado em decantação (A), o conteúdo do Becker, contendo o solo foi transferido para um Becker de material plástico para receber tratamento com o líquido extrator, solução de NaOH 0,5 mol/L (B) e ao lado a mesma solução com NaOH a 0,5 mol/L, após 24 horas (C).

Depois de 24 horas o líquido sobrenadante foi transferido para um Becker sem que se deixasse passar a interface que foi descartada juntamente com o restante do decantado. Posteriormente o líquido foi acidificado com solução de HCl a 6 mol/L (figura 4(A)), para a separação dos ácidos húmicos e fúlvicos (figura 4 (B)).



Figura 4: Solução no instante que recebeu o ácido HCl a 6 mol/L (A) e depois de 48 horas de decantação (B).

Percebeu-se a precipitação do ácido húmico uma cor marrom a preto e uma solução contendo o ácido fúlvico de cor amarelada e marrom. Campos et al., (2007) em um de seus estudos lembra que as cores marrom e amarela, são resultados que confirmam a presença de ácidos fúlvicos; e conforme estudos de Brum (2005) a

coloração da solução contendo ácido húmico (AH) varia de amarelo escuro a preto em função da concentração.

6.1.2 Purificação dos ácidos húmicos.

Para a purificação dos ácidos húmicos usou-se a resina de troca iônica IR 120 que é uma resina catiônica colocada em colunas cromatográficas.

Depois dos ácidos purificados, algumas amostras foram levadas a mufla, realizando-se o teste para verificação do teor de cinzas, onde o valor encontrado foi de 3,1% considerado um ótimo valor, já que se espera que o teor de cinzas seja menor que 5%.

A vantagem de extrair SHs com baixo teor de cinzas é diminuir etapas de purificação as quais sempre causam perda de material e possibilitam modificações estruturais nas SHs (ROSA et al., 2000).

Foram realizados testes com o nitrato de prata a 0,1 mol/L para verificação da presença de metais. No teste realizado, não houve reação com o nitrato de prata reafirmando que o ácido extraído foi realmente purificado com a resina.

6.1.3 Características dos ácidos húmicos pelo exame no infravermelho e ultravioleta e visível (UV-vis)

O ácido húmico extraído e o ácido húmico Sigma-Aldrich® apresentaram bandas de absorção na mesma região. A figura 5 mostra o ácido húmico extraído, (figura 5 – A) o ácido húmico Sigma-Aldrich® (figura 5 – B) e o ácido fúlvico extraído (figura 5 – C) através da espectroscopia no espectrofotômetro de Infravermelho.

Todas as frações apresentam uma banda de absorção na região de 3.300 a 3.400 cm^{-1} devido ao estiramento OH, NH. As bandas na região de aproximadamente 2.900 cm^{-1} também aparecem em todos os espectros. Essas bandas são atribuídas ao estiramento simétrico de C-H alifático (-CH, -CH₂, -CH₃) dos grupos metil e/ou metileno alifáticos. Na região entre 2.400 a 2.700 aparecem bandas características de estiramento O-H de H ligado fortemente a grupos carboxílicos (COOH). Na região de aproximadamente 1.600 cm^{-1} observa-se nos espectros, uma banda característica de aromáticos. Essas bandas são atribuídas ao estiramento C=C do anel aromático, isto é,

as vibrações de anel aromático conjugado com C=O (deformação C=O de cetonas conjugadas) e/ou COO⁻. Também podem ser devido ao estiramento anti-simétrico do grupo carboxilato e ao estiramento C=O do grupo COOH, devido ao hidrogênio ligado a grupo OH em posição orto, como no ácido salicílico. Entre 1.370 e 1.440 cm⁻¹ notam-se bandas provenientes de grupos C-H alifáticos, deformação O-H e/ou estiramento simétrico do COO⁻ de ácidos carboxílicos. Na região entre 1.100 e 950 cm⁻¹ observa-se bandas que podem ser atribuídas a estiramento C-O de alcoóis e/ou fenóis e/ou carboidratos. Todos estes resultados também foram encontrados por Di Bernado et al. (2005) e Paula (1992), em seus trabalhos com a extração das SHs.

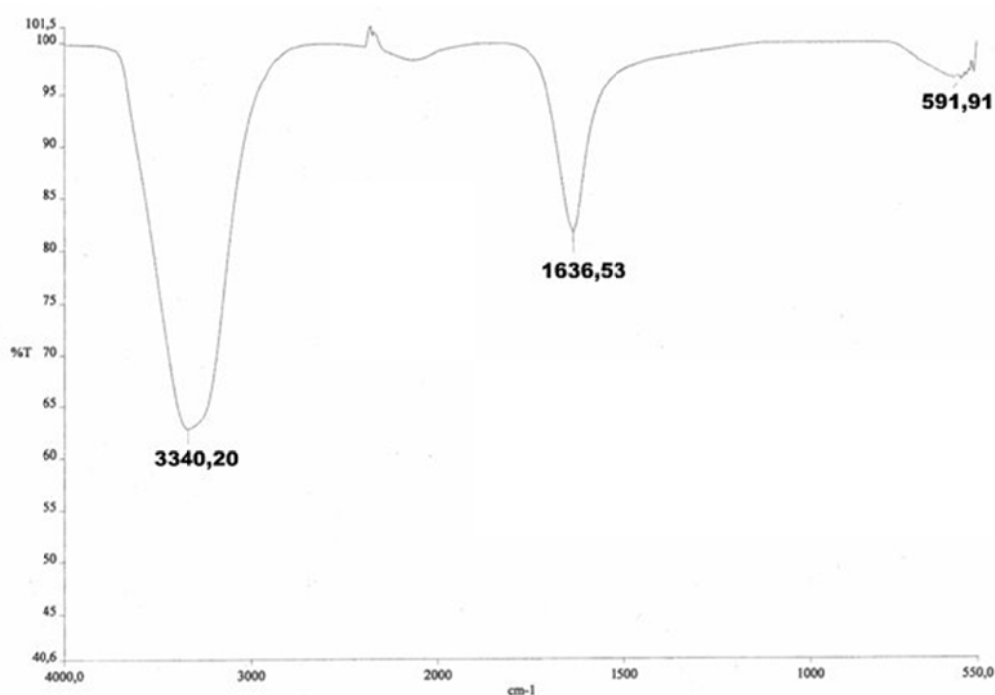


Figura 5 (A): Espectroscopia do ácido húmico extraído no espectrofotômetro de Infravermelho.



Figura 5 (B): Espectroscopia do ácido húmico da Sigma-Aldrich® no espectrofotômetro de Infravermelho.

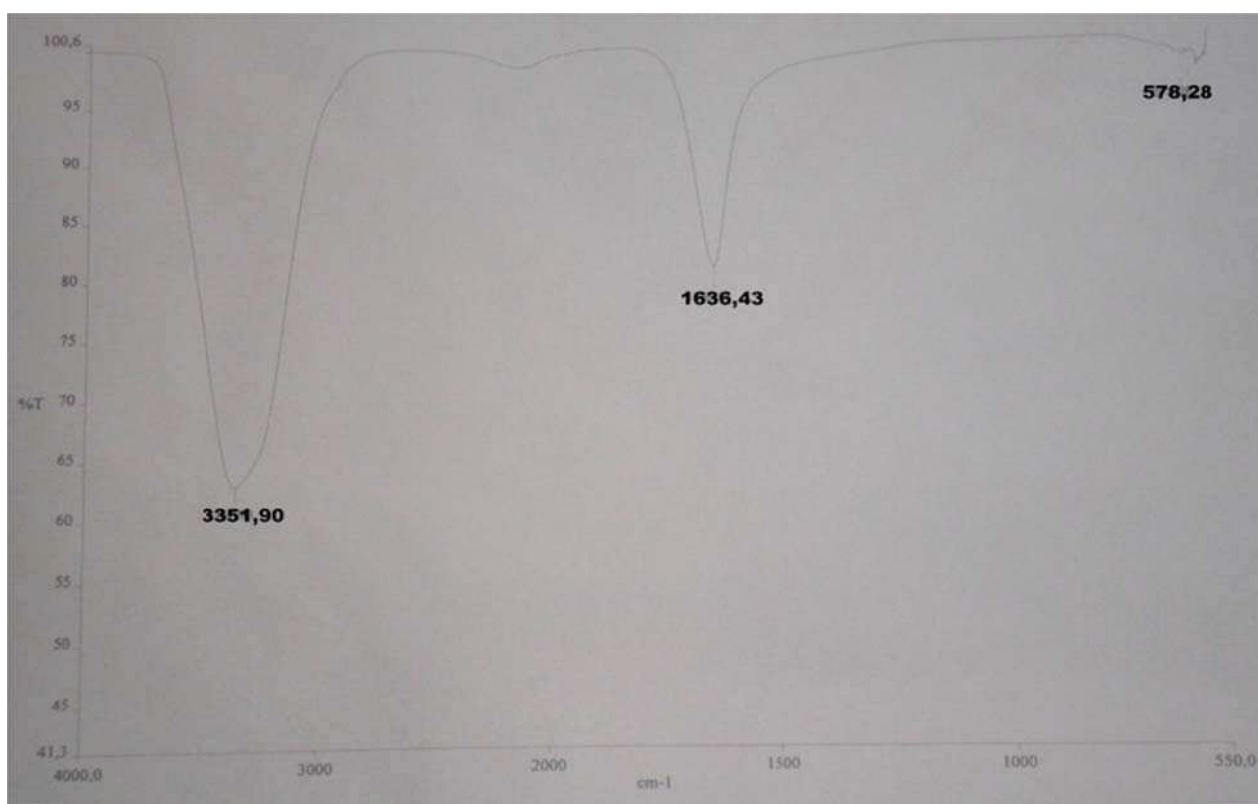


Figura 5 (C): Espectroscopia do ácido fúlvico extraído no espectrofotômetro de Infravermelho.

Na Figura 6, observa-se o espectro do ácido húmico extraído na região do UV-Vis obtido entre 200 e 900 nm através de uma cubeta de quartzo. Observa-se que no comprimento de onda em torno de 250 nm o ácido húmico apresenta pico de absorvância, estando de acordo com o estudo de Brum (2005). Segundo Wiecheteck et al. (2004) a capacidade de absorvância UV 254 nm são medidas indiretas indicadoras da presença de substâncias húmicas na água. Este fenômeno é devido à presença de uma variedade de grupamentos que mascaram a contribuição de um composto único (Brum, 2005).

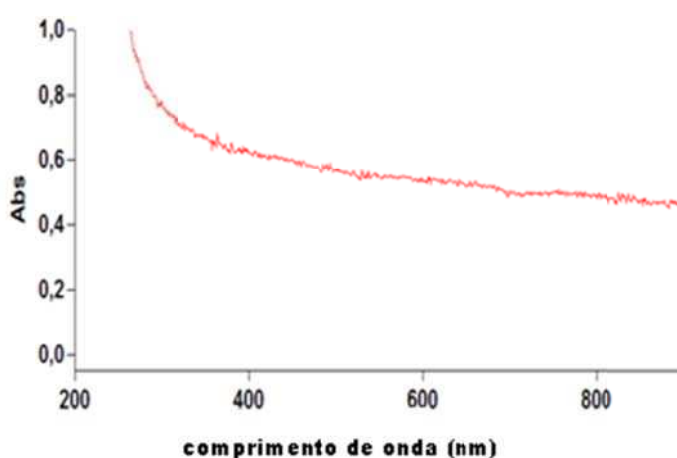


Figura 6: Espectro do ácido húmico extraído na região do ultravioleta e visível

6. 2 ANÁLISES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para os cálculos das análises enzimáticas foram feitas correção do grau de diluição das amostras. Para os cálculos estatísticos foram utilizadas as médias das alíquotas (repetições) coletadas.

Todos os resultados, assim como os cálculos estatísticos da atividade enzimática se encontram no final da dissertação no apêndice A.

As variáveis analisadas nos gráficos foram nomeadas de amostras de pH 3,0, pH 5,0 e pH 7,0 pois foram adicionadas as amostras no 10º dia, soluções de ácidos fúlvicos com estes respectivos pHs, ficando as soluções em pH 3,0, 5,0 e 7,0.

Lembrando que as coletas das alíquotas feitas no 10º dia não tinham ainda a presença de ácido fúlvico com estes respectivos pHs.

6. 2. 1 Resultado da atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* no ensaio com o ácido fúlvico na incubadora agitadora Shaker

A figura 7 mostra a produção da atividade enzimática da Lcc de *P. sanguineus* no 10º dia lembrando que a amostra que recebeu o ácido fúlvico de pH 3,0 teve uma maior atividade com $1,79 \text{ U.mL}^{-1}$. De acordo com trabalho de Garcia (2006) que avaliou o pH na atividade enzimática de *P. sanguineus*, verificou-se, produção enzimática entre a faixa de 2,0 a 7,0, mas o pH ótimo de atuação ficou entre 4,0 e 5,0.

A atividade enzimática de *P. sanguineus* na produção da Lcc no 15º dia foi maior na amostra que recebeu a solução de ácido com pH 3,0 confirmando o que tinha ocorrido no 10º dia (figura 7).

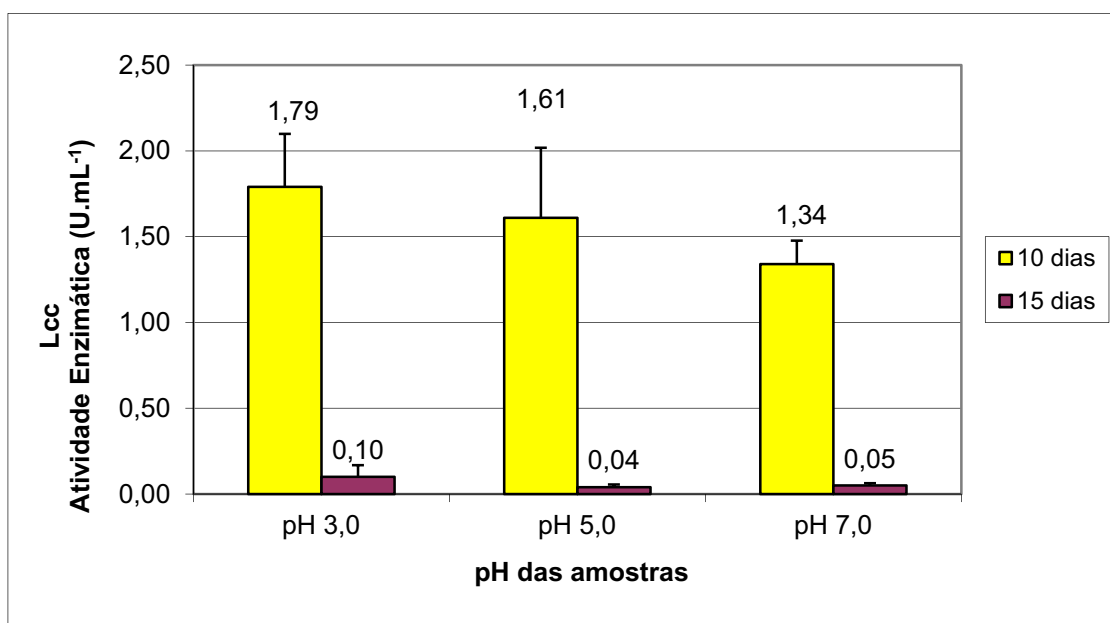


Figura 7: Determinação da atividade enzimática (U.mL^{-1}) da Lacase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras no 10º e 15º dia para os ensaios com ácido fúlvico

No Teste de ANOVA para a Lcc do *P. sanguineus* realizado entre as amostras analisadas do 10º dia e aquele realizado entre as amostras do 15º dia, não houve significância estatística já que p foi maior que 0,05.

A Produção de LiP foi baixa, conforme os resultados obtidos tanto na produção do 10º dia (figura 8) quanto no 15º dia. A atividade da LiP ficou em $0,34 \text{ U.mL}^{-1}$, no 10º dia e $0,001 \text{ U.mL}^{-1}$ no 15º dia, sendo a maior atividade da LiP $0,38 \text{ U.mL}^{-1}$, encontrada em pH 5,0 no 10º dia. Dependendo da substância que se deseja

remover ou degradar e branquear a LiP em comparação com a Lcc são os biocatalisadores de escolha para o branqueamento e diminuição da cor (MACIEL et al., 2010.)

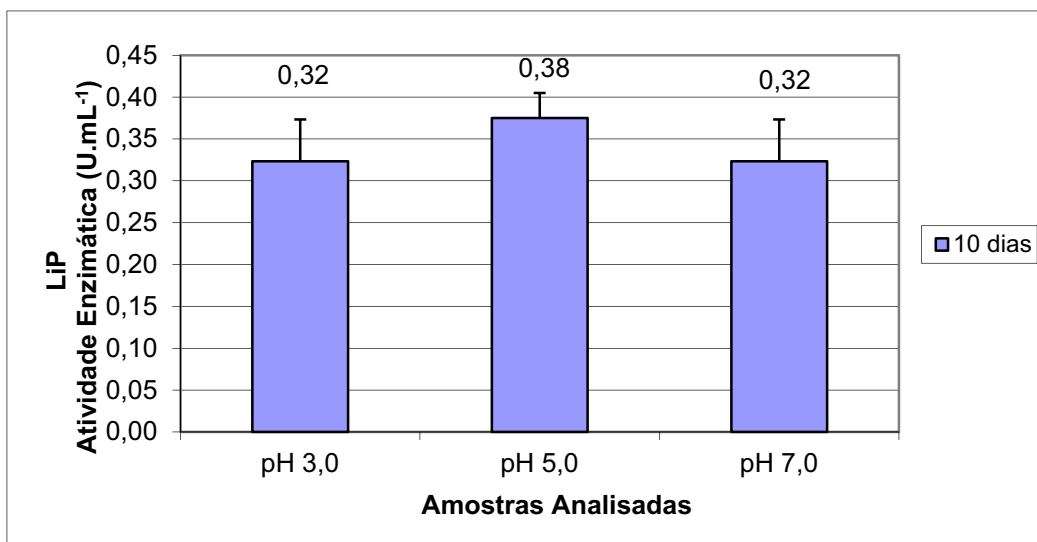


Figura 8: Determinação da atividade enzimática (U.mL⁻¹) da Lignina peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras no 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico.

O Teste de ANOVA para a produção enzimática de LiP de *P. sanguineus* realizado entre as amostras analisadas do 10º dia e entre as amostras analisadas do 15º dia não apresentou significância estatística nem entre as amostras analisadas do 10º dia, nem entre as amostra do 15º dia, já que p foi maior que 0,05.

A Produção de MnP foi baixa, conforme os resultados obtidos tanto na produção do 10º dia e ainda menor no 15º dia, sendo zero (figura 9).

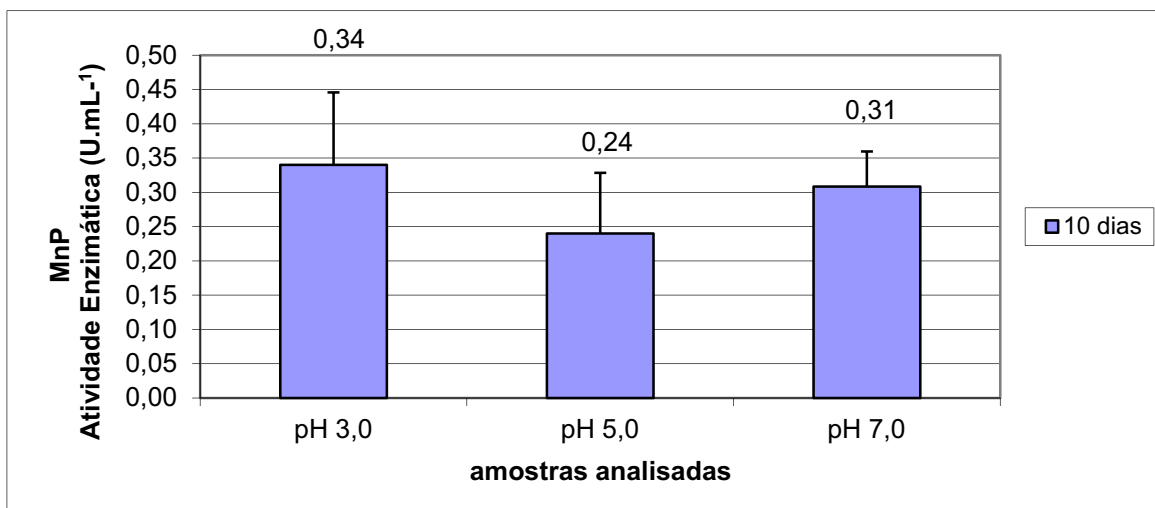


Figura 09: Determinação da atividade enzimática (U.mL⁻¹) da Manganês peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras no 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico.

A produção da MnP ficou em 0,3 U.mL⁻¹, no 10º dia e 0 U.mL⁻¹ no 15º dia, sendo a maior atividade encontrada em pH 3,0 no 10º dia.

No Teste de ANOVA para a produção enzimática de MnP do *P. sanguineus* entre as amostras analisadas do 10º dia não apresentaram significância estatística, já que p foi maior que 0,05. O mesmo ocorreu entre as amostras analisadas do 15º dia.

Nos ensaios para verificação da produção enzimática a enzima Lcc apresentou uma produção maior que as outras enzimas analisadas, confirmando a observação de Garcia (2007), de que o gênero *Pycnoporus* é capaz de produzir várias enzimas com aplicação industrial, mas a característica mais relevante do gênero é produzir Lcc.

6.2.2 Resultado da Atividade Enzimática de *Trametes villosa* no ensaio com o ácido fúlvico no Shaker

A figura 10 (A), mostra a produção da atividade enzimática da Lcc de *T. villosa* no 10º dia, a amostra que recebeu o ácido fúlvico de pH 5,0 obteve uma maior atividade, com produção de 2,35 U.mL⁻¹.

Estes resultados são considerados bons, ainda mais que a Lcc é uma enzima muito utilizada em descoloração e degradação; de acordo com Pointing e Vrijmoed (2000), a descoloração baseada nos tratamentos da Lcc são potencialmente vantajosas,

uma vez que a enzima é produzida em maiores quantidades e é freqüentemente produzida constitutivamente ou requer menores condições de indução do que as requeridas para a produção de LiP ou MnP.

Claus e Filip (1998) em seu trabalho obtiveram uma descoloração de até 50% na solução contendo substâncias húmicas com fungos, mas isso foi observado quando se utilizou uma preparação de Lcc de *Trametes versicolor*, e, especialmente, na presença de um mediador redox.

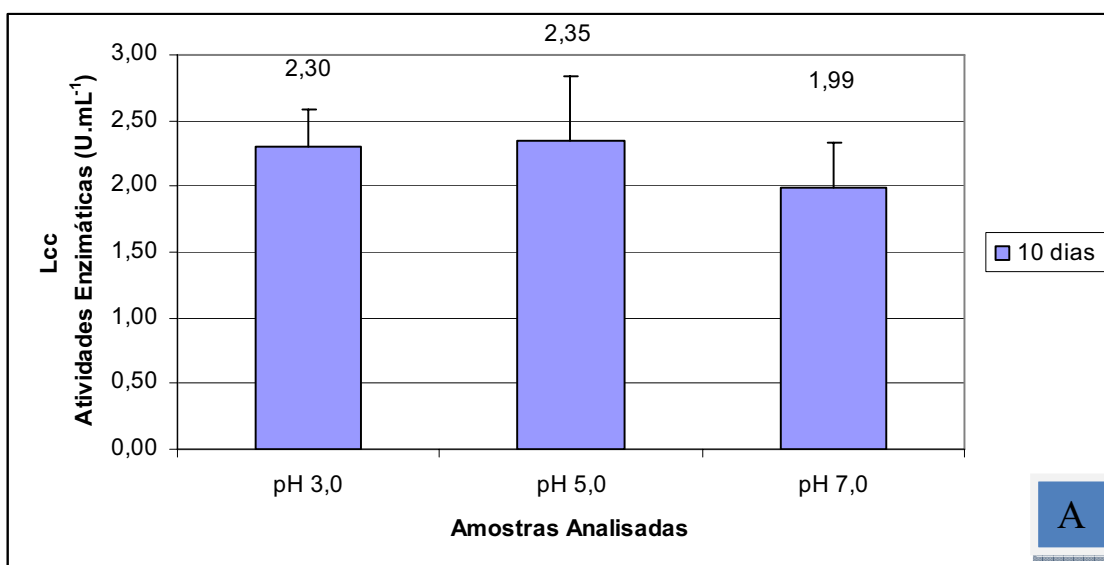


Figura 10 – A: Determinação atividade enzimática (U.mL⁻¹) da Lacase de *Trametes villosa* em todas as amostras no 10^o dia para os ensaios com ácido fúlvico.

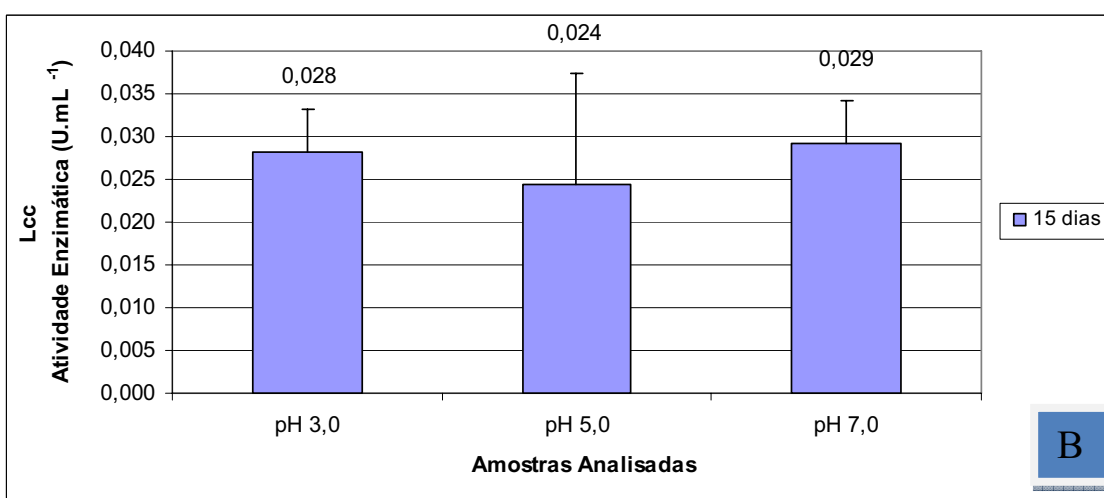


Figura 10 – B: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Lacase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 15^o dia para os ensaios com ácido fúlvico.

A atividade enzimática da Lcc de *T. villosa* no 15º dia (figura 10 (B)) foi maior na amostra que recebeu o ácido de pH 7,0, diferente do que tinha ocorrido no 10º dia.

No Teste de ANOVA para a Lcc do *T. villosa* tanto das amostras analisadas do 10º, como na análise estatística das amostras do 15º dia, não apresentou significância estatística já que p foi maior que 0,05. O valor de p foi igual a 0,495 no 10º dia e 0,775 no 15º dia.

A atividade enzimática da LiP ficou em $0,12 \text{ U.mL}^{-1}$, no 10º dia e bem diferente do valor encontrado para *P. sanguineus* nas mesmas condições. A atividade enzimática da LiP para *T. villosa* no 15º dia não foi significativo já que a maioria dos valores foram iguais a 0.

A produção enzimática mais alta da LiP pelo *T. villosa* foi encontrada na amostra que recebeu o ácido fúlvico com pH 5,0 no 10º dia (figura 11). É surpreendente a pequena produção de LiP e MnP, nestes ensaios, já que estas enzimas foram relatados como eficazes nas descoloração de efluentes de fábricas de celulose, segundo estudos de Maciel et al. (2010).

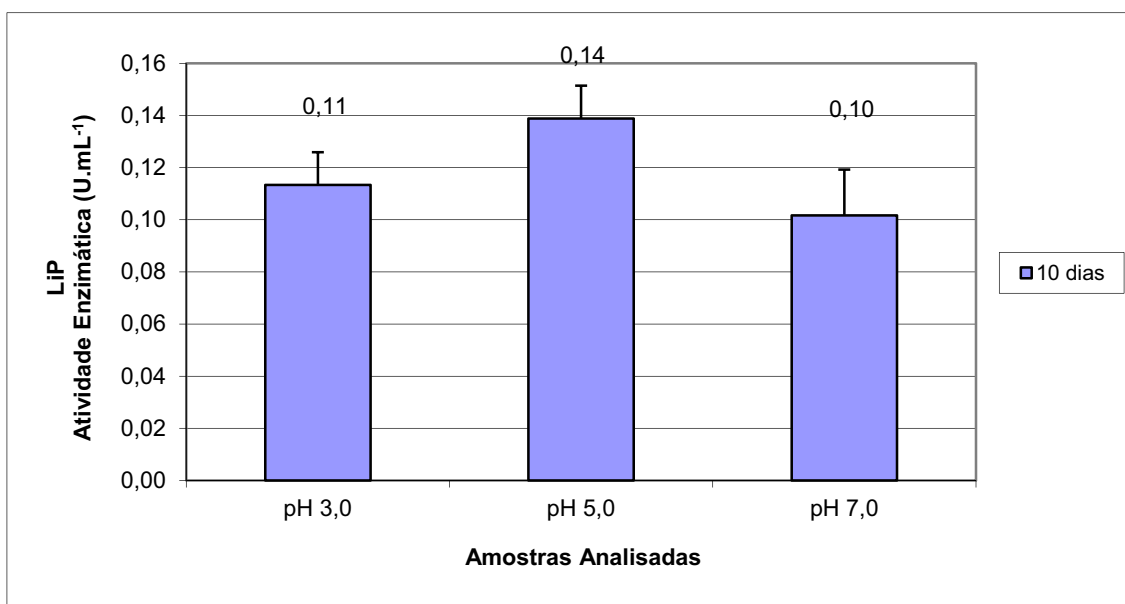


Figura 11: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL^{-1}) da LiP de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10º dia para os ensaios com ácido fúlvico.

No Teste de ANOVA para a produção enzimática de LiP do *T. villosa* entre as amostras do 15º dia não apresentaram significância estatística já que p foi $>0,05$. O teste ANOVA realizado entre as amostras do 10º dia na produção de LiP de *T. villosa* apresentou significância estatística onde, p foi $<0,05$.

Isso mostra que as amostras no 10º dia não mostraram uma homogeneidade, por isso as amostras de produção de LiP por *T. villosa* foram submetidas ao Teste de Tukey para verificar quais as amostras que interferiram no resultado.

A Produção de MnP para *T. villosa* foi baixa, conforme os resultados obtidos tanto na produção do 10º dia e no 15º. No Teste de ANOVA para a produção enzimática de MnP do *P. sanguineus* tanto entre as amostras do 10º dia e entre as amostras do 15º dia não apresentaram significância estatística já que p foi $> 0,05$.

6.2.3 Teste de Tukey da avaliação da atividade enzimática de *T. villosa* na produção de LiP

O teste de Tukey tem como base a diferença mínima significativa. O teste ANOVA realizado apresentou significância na produção enzimática por *T. villosa* da LiP no 10º dia, e através do Teste de Tukey foi possível achar a média da amostra que interferiu na significância estatística. O quadro 4, mostra o resultado do teste de Tukey.

Quadro 4: Teste de Tukey para amostras das atividades enzimáticas de LiP por *Trametes villosa* no 10º dia.

LiP		p
10 dias		
pH 3,0	pH 5,0	0,117
pH 3,0	pH 7,0	0,551
pH 5,0	pH 7,0	0,030

Ao se comparar a amostra chamada de pH 3,0 com as de pH 5,0 e 7,0 não foi encontrado nenhuma significância estatística, mas ao se comparar as amostras chamadas de pH 5,0 com as de pH 7,0 verificou-se que houve uma significância estatística de p obteve um valor abaixo de 0,05.

Ao observar o apêndice A, pode se notar que o motivo desta significância estatística ocorreu pela queda da produção de LiP de *T. villosa* no 10º dia das amostras

de pH 5,0 para as de pH 7,0 onde o pH 5,0 obteve uma produção enzimática de 0,14 U.mL⁻¹ enquanto a amostra chamada de pH 7,0 obteve no 10º dia uma produção de 0,10 U.mL⁻¹.

Essa diferença nas médias foi que deixou o valor de p menor que 0,05 provocando a significância estatística.

Se fizermos uma comparação da produção enzimática com os pHs podemos perceber que amostras chamadas de pH 3,0 e 5,0 obtiveram uma maior produção, sem diferenças significativas entre eles e uma menor produção ocorreu em pH 7,0. Apesar de que todas as amostras dos diferentes pHs obtiveram produção de Lcc. O que corrobora com resultados de Garcia (2005) que mostrou atividade de Lcc entre 3,0 e 7,0.

6.2.4 Teste T Pareado da atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* e de *Trametes villosa* com Ácido Fúlvico

O teste T Pareado é um teste estatístico para definir o nível de semelhança ou diferença entre dois momentos de uma mesma amostra. Ao contrário do Teste de Tukey comum, que compara as médias e as variâncias, esse teste estuda as diferenças entre duas situações de uma mesma amostra. Este teste foi utilizado para analisar as amostras das atividades enzimáticas da Lcc, LiP e de MnP no 10º dia com o 15º dia.

Em *P. sanguineus* e em *T. villosa* nas amostras comparadas do 10º com a do 15º dia tanto de Lcc, LiP e MnP apresentaram um valor de p menor que 0,05. Esta significância estatística foi promovida pelas quedas enzimáticas que ocorreram nas amostras do 10º para o 15º dia.

O potencial redox do sistema da MnP é menor do que a da LiP e tem mostrado capacidade para oxidar substratos fenólicos *in vitro*. Por outro lado ao contrário da LiP, MnP pode oxidar sem H₂O₂ (MACIEL et al., 2010).

Estas quedas das atividades enzimáticas podem ter ocorrido devido a uma menor adaptabilidade do fungo ao pH da solução de ácido colocada em contato com o fungo no 10º dia.

Já no caso de *T. villosa* as amostras comparadas no Teste T pareado do 10º com a do 15º dia de MnP apresentaram um valor de p maior que 0,05. Isso pode ser explicado pelo valor baixo de produção enzimática de LiP no 10º dia, devido essa produção ter sido extremamente baixa, ela não se diferenciou da produção do 15º dia, o

que provocou um valor de p maior que 0,05, não provocando assim a significância estatística.

6.2.5 Resultado da produção enzimática por *P. sanguineus* e *T. villosa* na presença de ácido húmico adquirido do laboratório da Sigma-Aldrich® e do ácido húmico extraído

Pelas análises estatísticas descritivas da produção enzimática de *T. villosa* foi possível notar que a produção enzimática para o ensaio com o ácido húmico da enzima Lcc (figura 12) foi maior do que os outros índices encontrados nos ensaios com o ácido fúlvico.

Houve uma diminuição significativa da atividade da Lcc de *T. villosa* do 10º para o 15º dia, assim como também uma queda brusca na produção de LiP e MnP, tanto no 10º como no 15º (figura 13, 14). Minussi et al. (2001) em seu trabalho com enzimas fúngicas obteve resultados que mostraram baixa atividade das peroxidases, LiP e MnP para as 19 espécies de fungos utilizados.

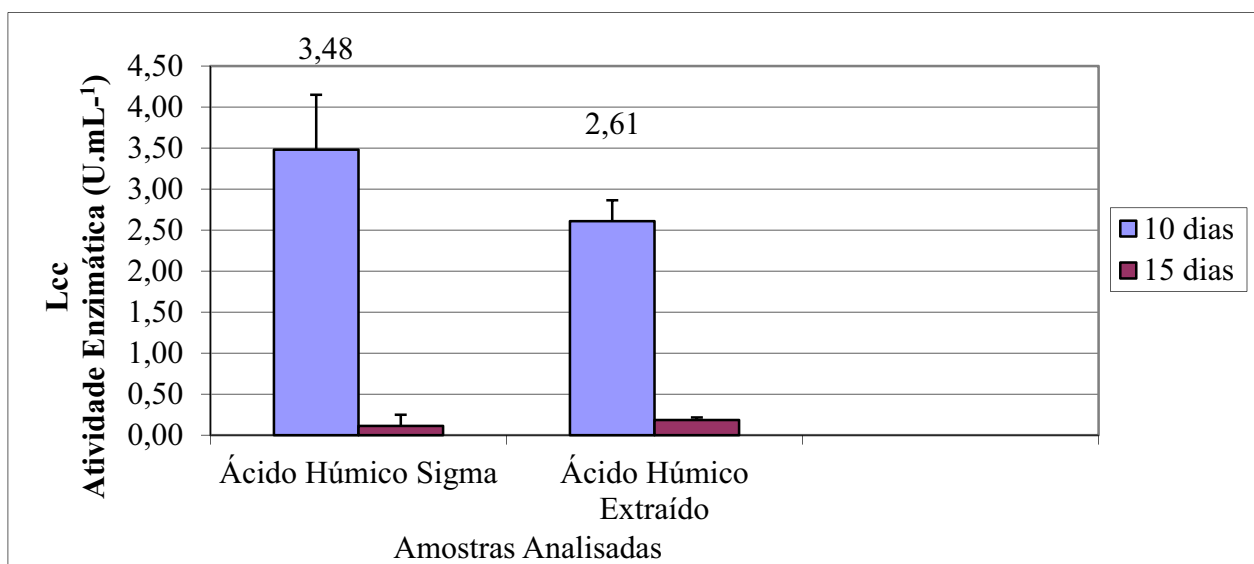


Figura 12: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Lacase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10º e 15º dia.

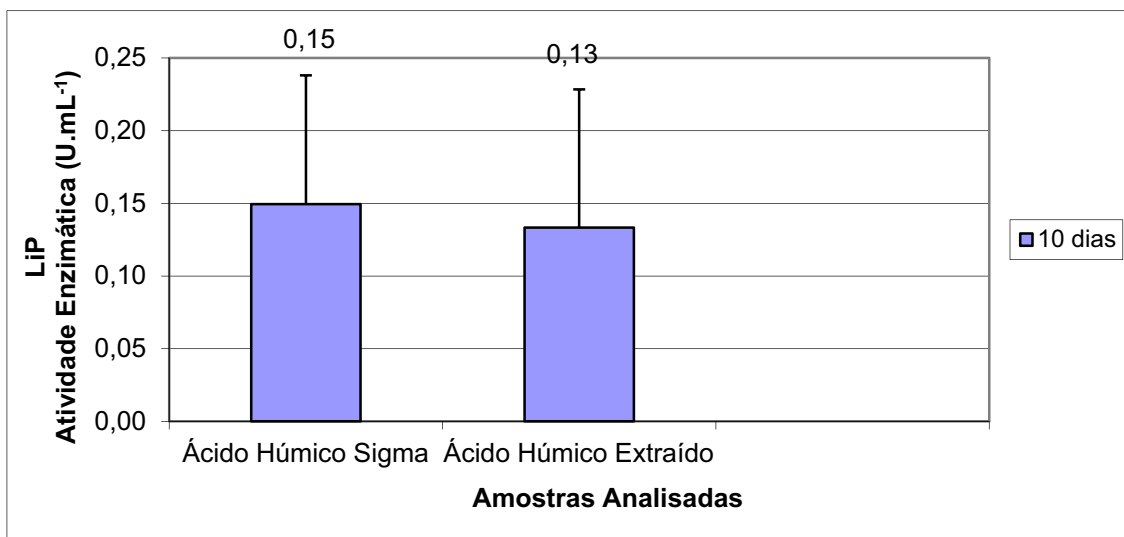


Figura 13: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Lignina Peroxidase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10^o dia.

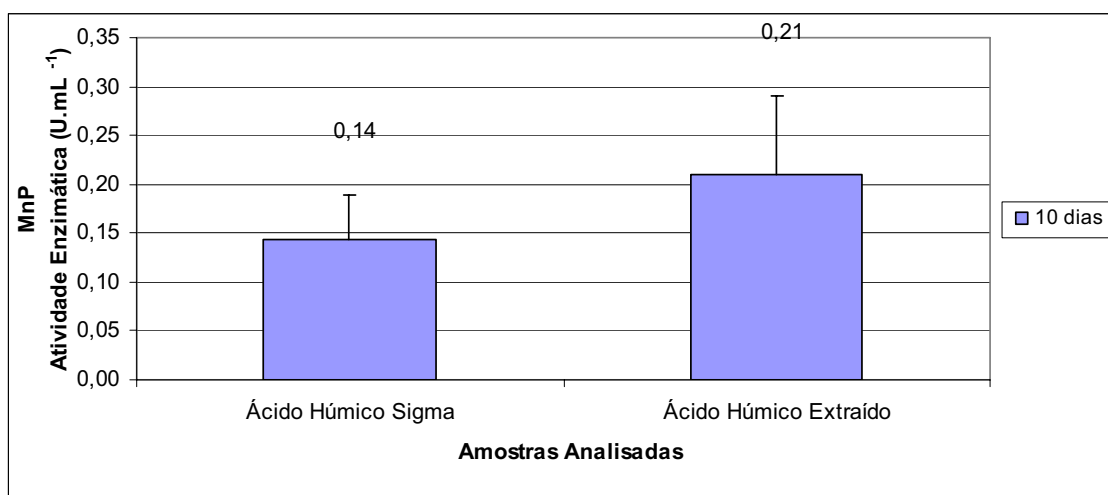


Figura 14: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Manganês Peroxidase de *Trametes villosa* em todas as amostras do 10^o dia.

T. villosa foi quem obteve uma maior produção de Lcc de 3,48 U.mL⁻¹ na produção para os ensaios com ácido húmico Sigma-Aldrich® e 2,61 U.mL⁻¹ na produção para os ensaios com o ácido húmico extraído se comparado com a produção de *P. sanguineus* (figura 15) que produziu 3,28 U.mL⁻¹ para o ensaio com o ácido húmico da Sigma-Aldrich® e 2,41 U.mL⁻¹ produzido para o ensaio com ácido húmico extraído. De acordo com estudos realizados por Duarte (2009) a cepa de *P. sanguineus* – CCT- 4518 e muito conhecida pela grande produção de Lcc.

Ambos os fungos *T. villosa* e *P. sanguineus* obtiveram uma baixa produção de Lcc no 15º, isso pode ter ocorrido devido à concentração alta dos ácidos o que pode ter levado a uma intoxicação fúngica, pois a quantidade de nutrientes foi bastante alta. Em relação a aspectos enzimáticos, há poucas informações sobre as mudanças químicas e físicas sofridas pelas substâncias húmicas durante a biodegradação devido a sua complexidade estrutural, isso faz com que a detecção analítica de suas mudanças seja extremamente difícil (Grinhut et al., 2007).

Nenhum dos resultados da produção enzimática tanto da LiP como de MnP, nos ensaios com ácido húmico extraído como para os ensaios com ácido húmico da Sigma-Aldrich® foram significativos. As figuras 16, 17 mostram a produção de LiP e MnP de *P. sanguineus*.

Steffem, (2003) em seu trabalho com algumas espécies de basidiomicetos para degradação de substâncias húmicas concluiu que a degradação resultou na formação polar, de menor massa molecular de ácidos fúlvicos (AFs) e dióxido de carbono, e que a decomposição dos ácidos húmicos foi consideravelmente reforçada na presença de Mn^{2+} , papel de MnP. Diferente do que aconteceu em nossos ensaios, já que a produção de MnP foi baixa e provavelmente não colaborou para a degradação dos ácidos húmicos.

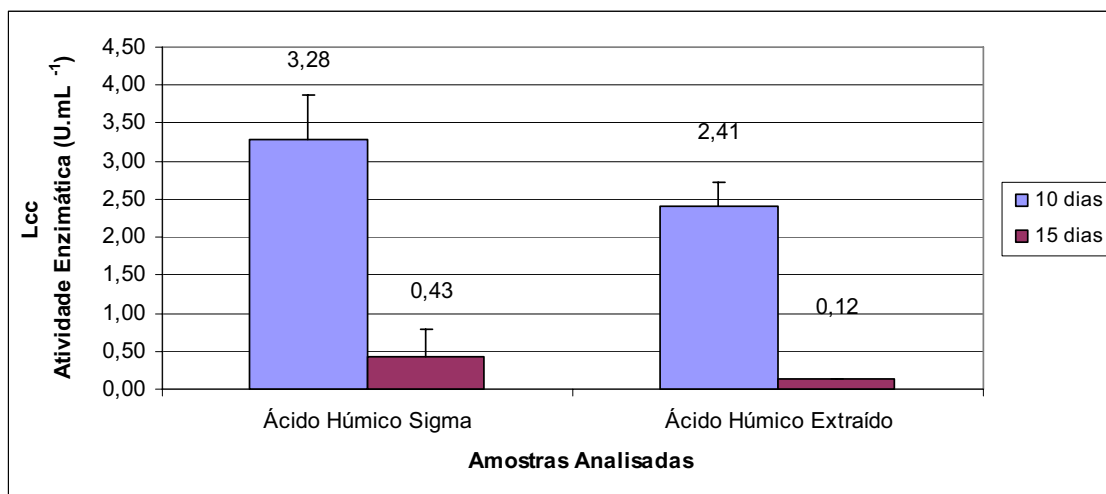


Figura 15: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Lacase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10º e 15º dia.

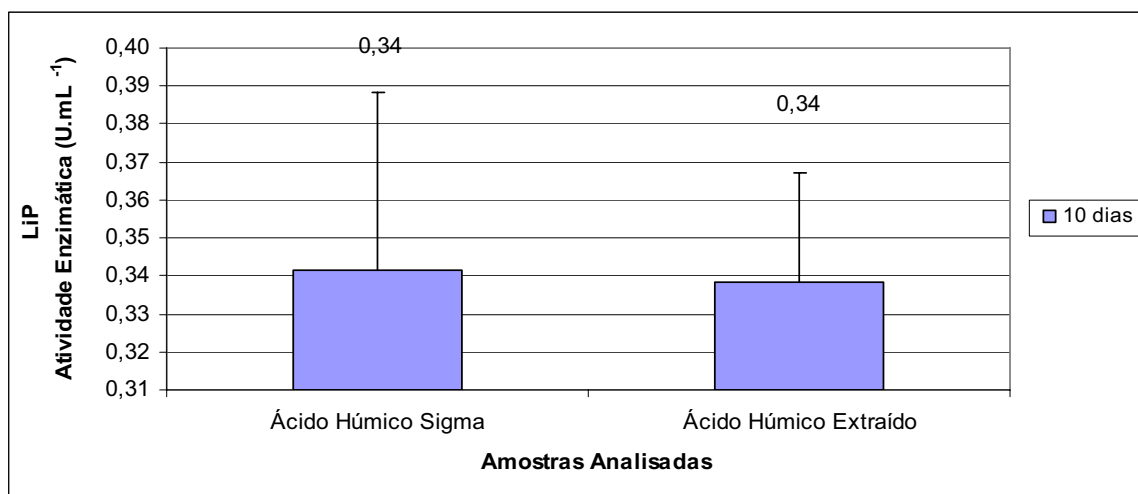


Figura 16: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Lignina Peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10^o dia.

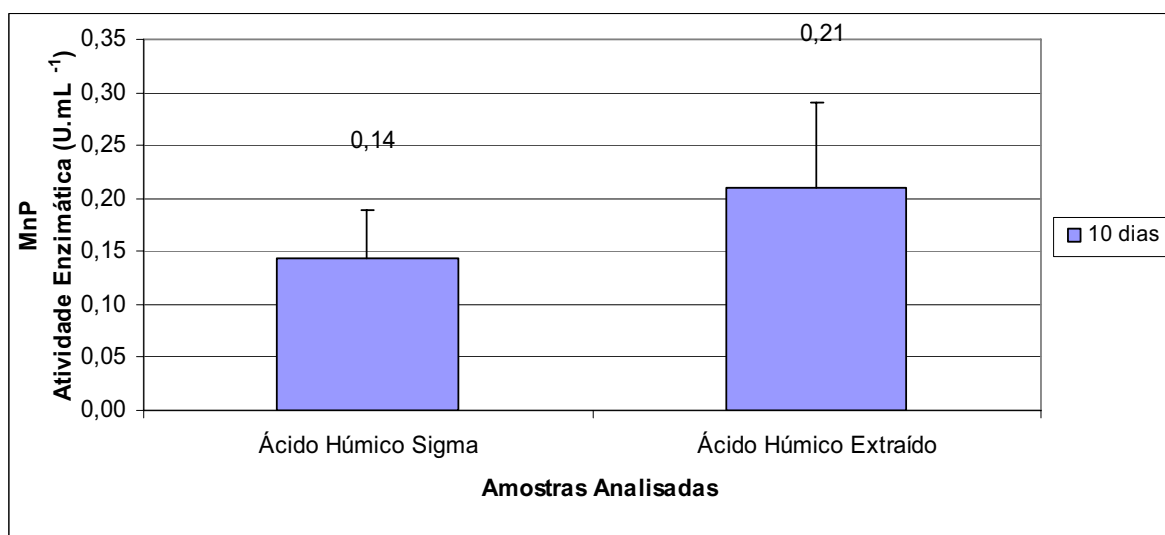


Figura 17: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) da Manganês Peroxidase de *Pycnoporus sanguineus* em todas as amostras do 10^o dia.

A predominância de produção enzimática foi sem dúvida da enzima Lcc, assim como na pesquisa de Jardim (2010) onde a enzima predominante em *T. villosa* e *P. sanguineus* também foi a Lcc. Já no trabalho realizado por Minussi (2002) a maior atividade de Lcc foi obtida com o fungo *Trametes versicolor* cultivados em meio líquido na presença de xilidina e cobre como indutores.

6.2.6 O crescimento da massa fúngica

O crescimento e desenvolvimento da biomassa, apresentada nas figuras seguintes mostra a formação em “pellets” e massa amorfa. As fotografias foram tiradas no 15º dia de cultivo do fungo e estão apresentadas nas figuras 18 e 19.

Observa-se que no Grupo de *T. villosa* e *P. sanguineus* com presença de ácido fúlvico os “pellets” estão pouco definidos e com formação de massa amorfa (figura 19, 20).

Estes mesmos fungos com presença de ácido húmico também apresentaram massa micelial irregular, mas com aspectos mais definidos, havendo uma formação gelatinosa em torno do ácido húmico o que provocou uma coagulação do ácido. Em estudo de Jardim (2010) para remoção de acefato o fungo *P. sanguineus* teve maior crescimento e desenvolvimento na presença de acefato a 50%.

Ao final dos ensaios, é possível notar que o sobrenadante apresentou aspecto mais límpido. As amostras com presença de ácido húmico (figura 21) ainda apresentaram uma formação “gelatinosa” que envolveu o ácido húmico como se um coagulante produzido pelos fungos em presença do ácido húmico.

Os fungos em estudo cresceram em temperatura de 28º C e em 15 dias, mas segundo Garcia (2006), *P. sanguineus* cresce melhor a 37ºC, atingindo um bom crescimento já no 5º dia. Talvez em maior temperatura os fungos em estudo teriam tido um maior crescimento.

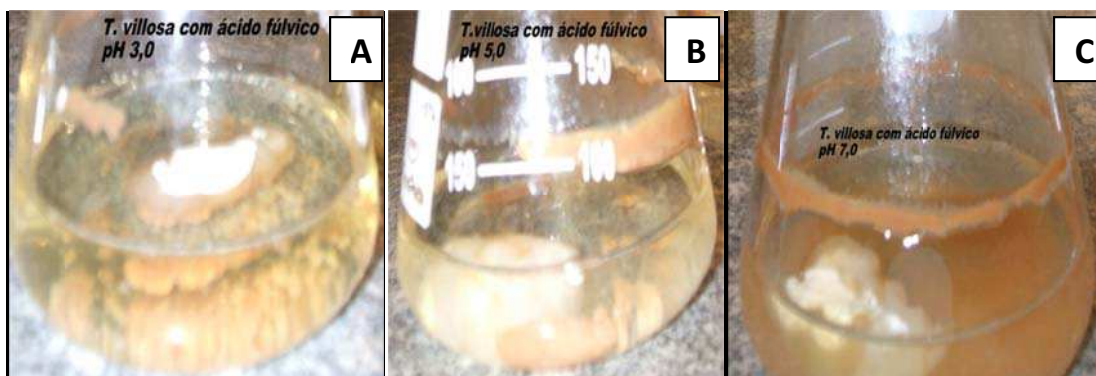


Figura 18: Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico de pH 3,0 (A), pH 5,0 (B), pH 7,0 (C) no 15°, após os ensaios no Shaker.

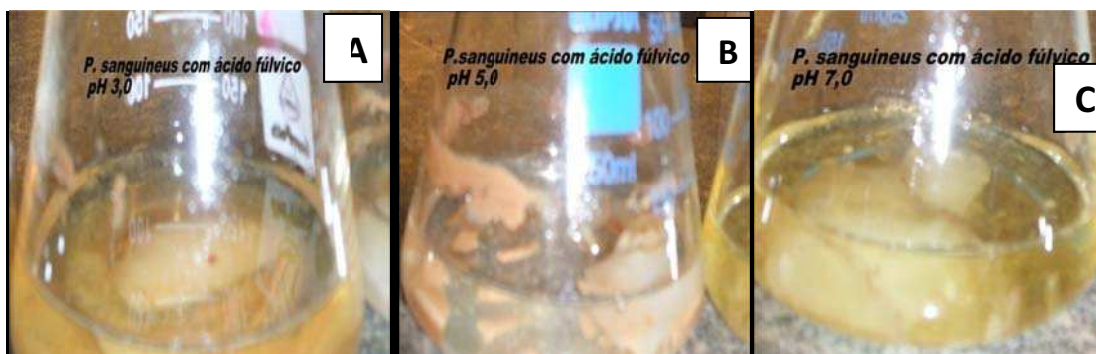


Figura 19: Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico de pH 3,0 (A), pH 5,0 (B), pH 7,0 (C) no 15°, após os ensaios no Shaker.



Figura 20: Fotografias dos erlenmeyers contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído (A), *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico extraído (B), no 15°, após os ensaios no Shaker.

6.2.7 Resultados das análise com o espectrofotômetro ultravioleta e visível (UV-Vis) para as amostras de *P. sanguineus* e *T. villosa* em presença de ácido fúlvico e sua correlação com a produção enzimática

Foram obtidos espectros de amostras utilizadas como controle que não receberam ácidos, tanto de *P. sanguineus* (figura 21) como de *T. villosa* para método de comparação com outras amostras. Badis et al. (2009) utilizaram este procedimento em seus estudos através da quantificação de ácidos húmicos em meio de cultura como a degradação (e, portanto, descoloração) dos ácidos húmicos e depois se mediu a taxa de diminuição da absorbância em comparação com as culturas não-inoculadas.

Os resultados das amostras de *P. sanguineus* em presença de ácido fúlvico em pH 3,0 (figura 22) para teste de degradação foram favoráveis, pois é possível notar pelos espectros obtidos no espectrofotômetro que houve uma redução da absorbância em relação ao comprimento de onda na região do UV como também da região visível. O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi de 93%, sendo menor no segundo trecho onde foram obtidos um índice percentual de 88%. Estudos realizados por Steffen (2003) com fungos basidiomicetos para degradação de substâncias húmicas indicam que basidiomicetos colonizam solos e estão envolvidos no volume de húmus através da reciclagem de alta massa molecular das substâncias húmicas. A figura 23 mostra as diferenças entre o gráfico da amostra do 10º dia sem o ácido com o ácido no 10º e com o ácido no 15º dia.

Houve diminuição do espectro da amostra de *P. sanguineus* em presença de ácido fúlvico em pH 5,0 (figura 23) para teste de degradação, mas se comparado ao pH 3,0 a redução foi menor, foi encontrado um índice de percentual de remoção no primeiro trecho de 69% e um índice percentual no segundo trecho de 25%. A amostra contendo ácido fúlvico em pH 7,0, também apresentou uma diminuição da absorbância em relação ao comprimento de onda, mas essa diminuição foi mais significativa no primeiro trecho dos espectro, onde foi encontrado índice de percentual de remoção 60%. No segundo trecho o índice percentual foi de 20% (figura 24).

Se correlacionarmos com a atividade enzimática é possível notar que a amostra de *P. sanguineus* que mais produziu Lcc foi à amostra de pH 3,0 sendo também aquela que apresentou maior diminuição do espectro do 10º para o 15º dia e apresentou maior índice percentual de remoção. Sendo a Lcc portanto responsável pela diminuição da cor desta amostra, pois segundo Maciel et al., (2010) as Lccs possuem um poder de

descoloração muito grande sendo usada em certos processos para melhorar ou modificar a aparência de cor de alimento ou bebida para a eliminação de compostos fenólicos indesejáveis, responsável pelo escurecimento da cerveja, a formação de névoa e turbidez em suco de fruta claro, e vinho.

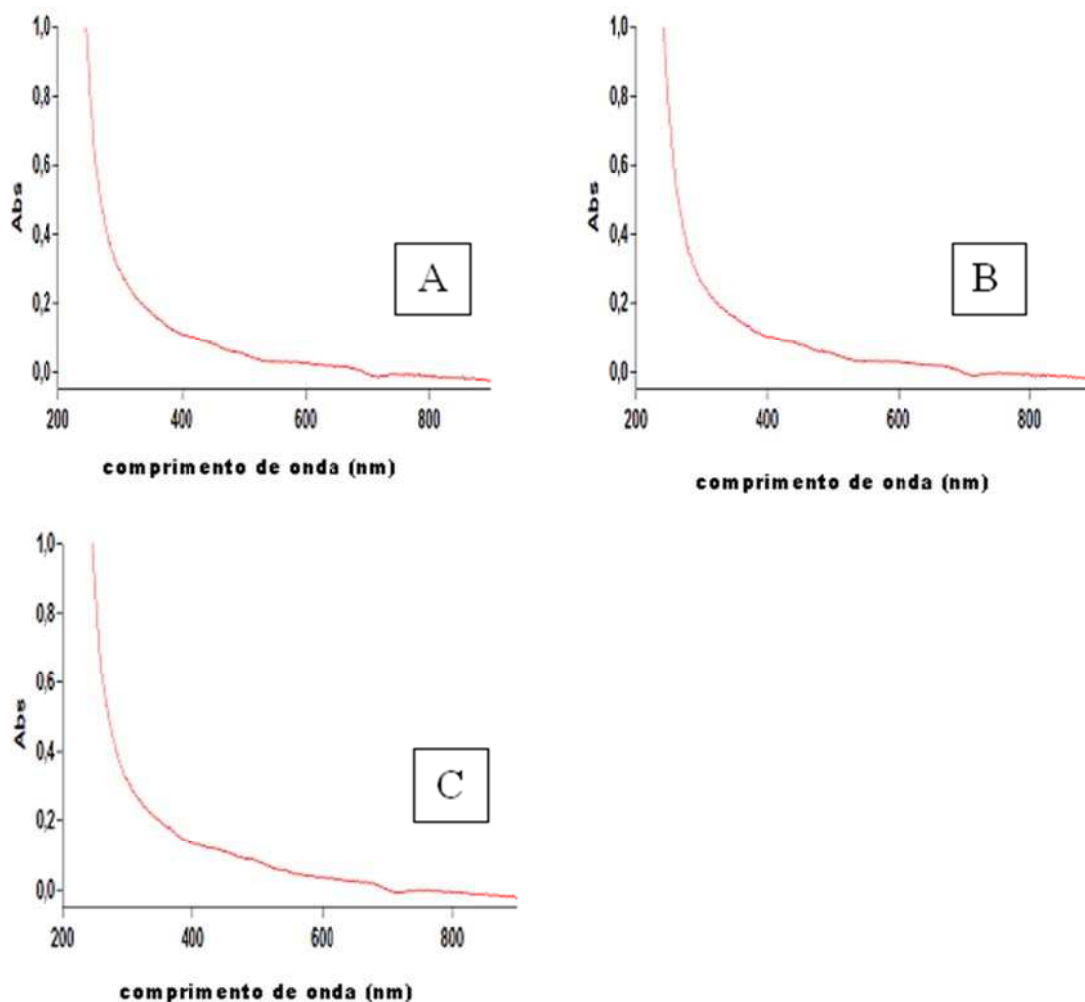


Figura 21: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* para controle no 10º dia antes de colocar água destilada e autoclavada (A) , com água autoclavada no 10º dia (B) e com água autoclavada no 15º(C) dia respectivamente.

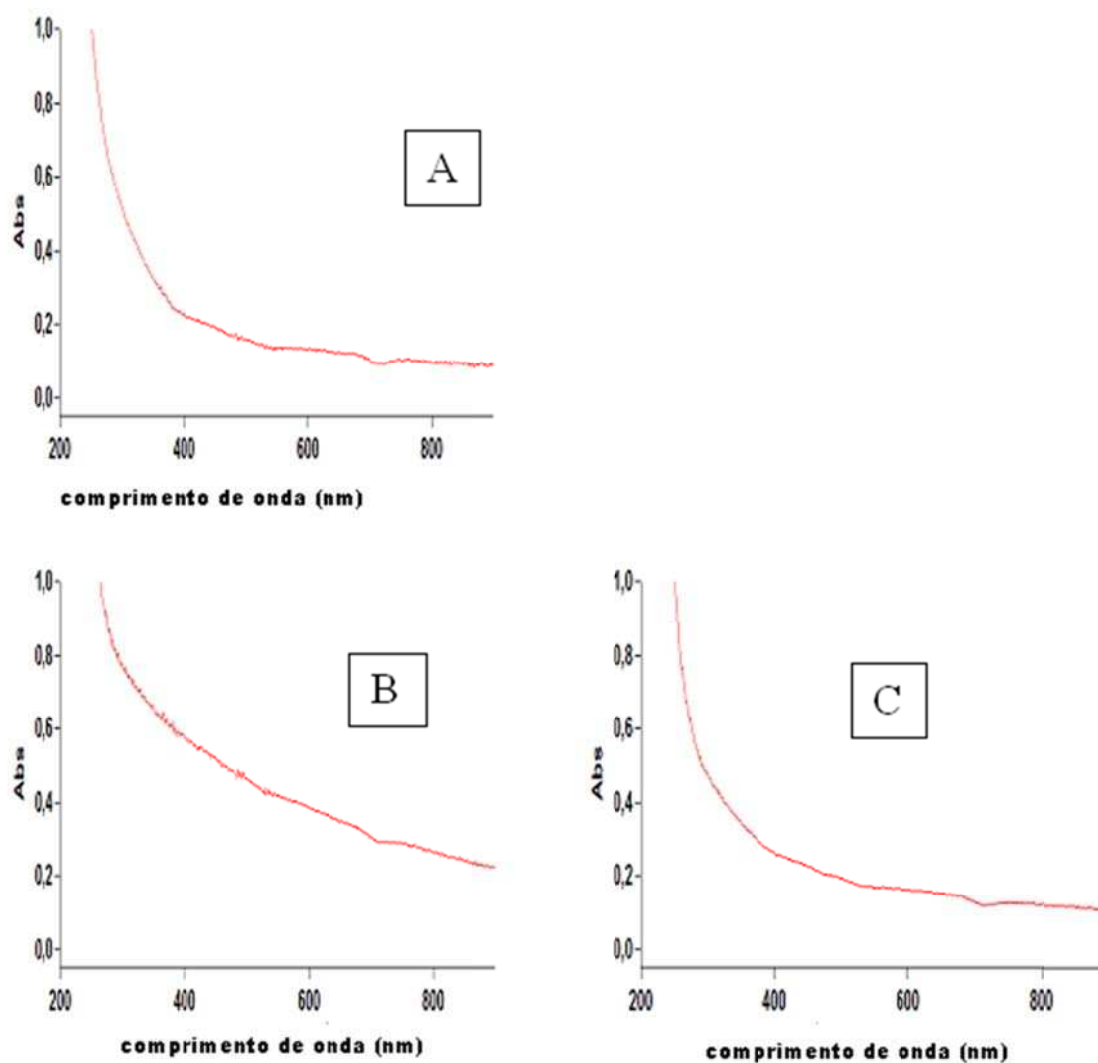


Figura 22: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido fúlvico em pH 3,0 no 10^o dia (A) o com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10^o dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 3,0 no 15^o dia (C).

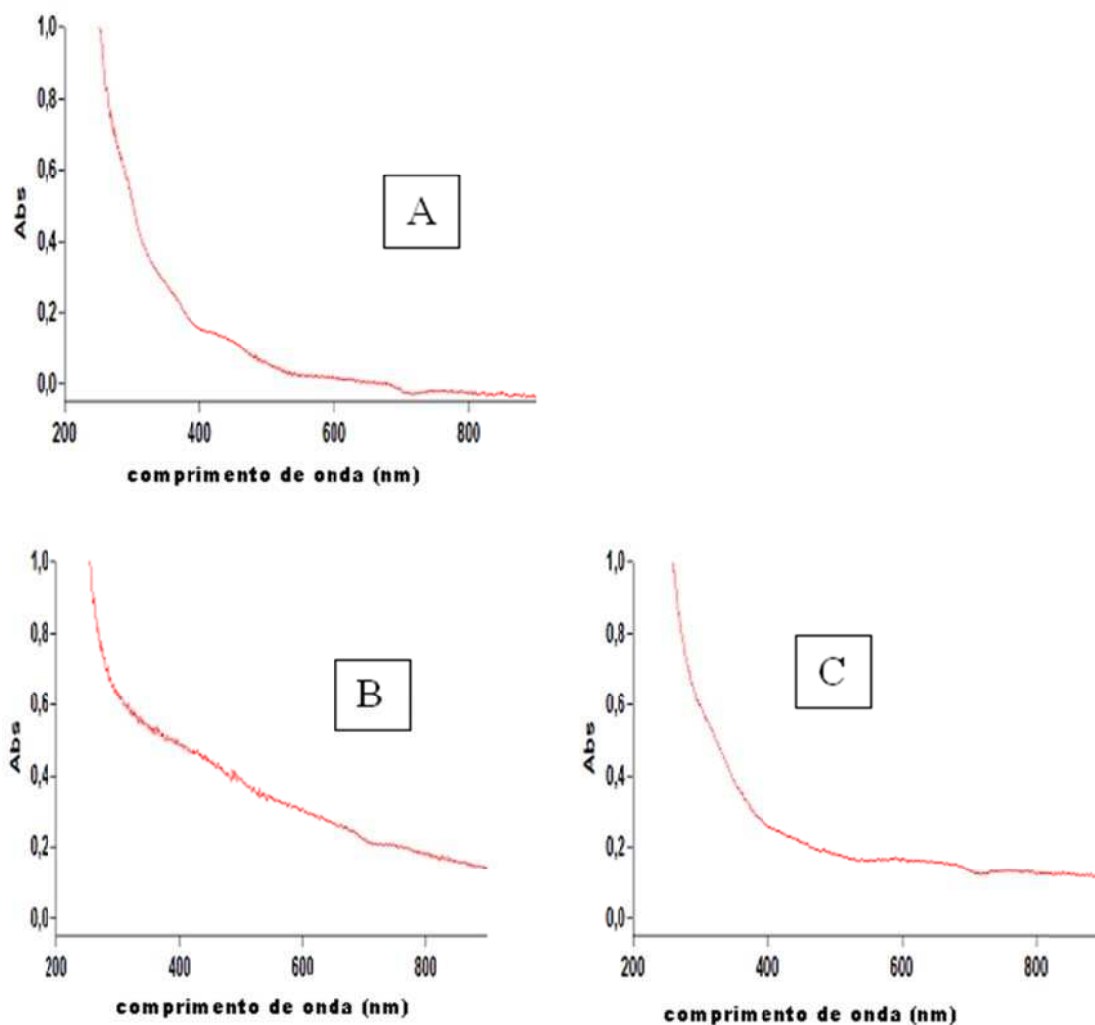


Figura 23: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido fúlvico em pH 5,0 no 10^o dia (A) com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10^o dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 5,0 no 15^o dia (C).

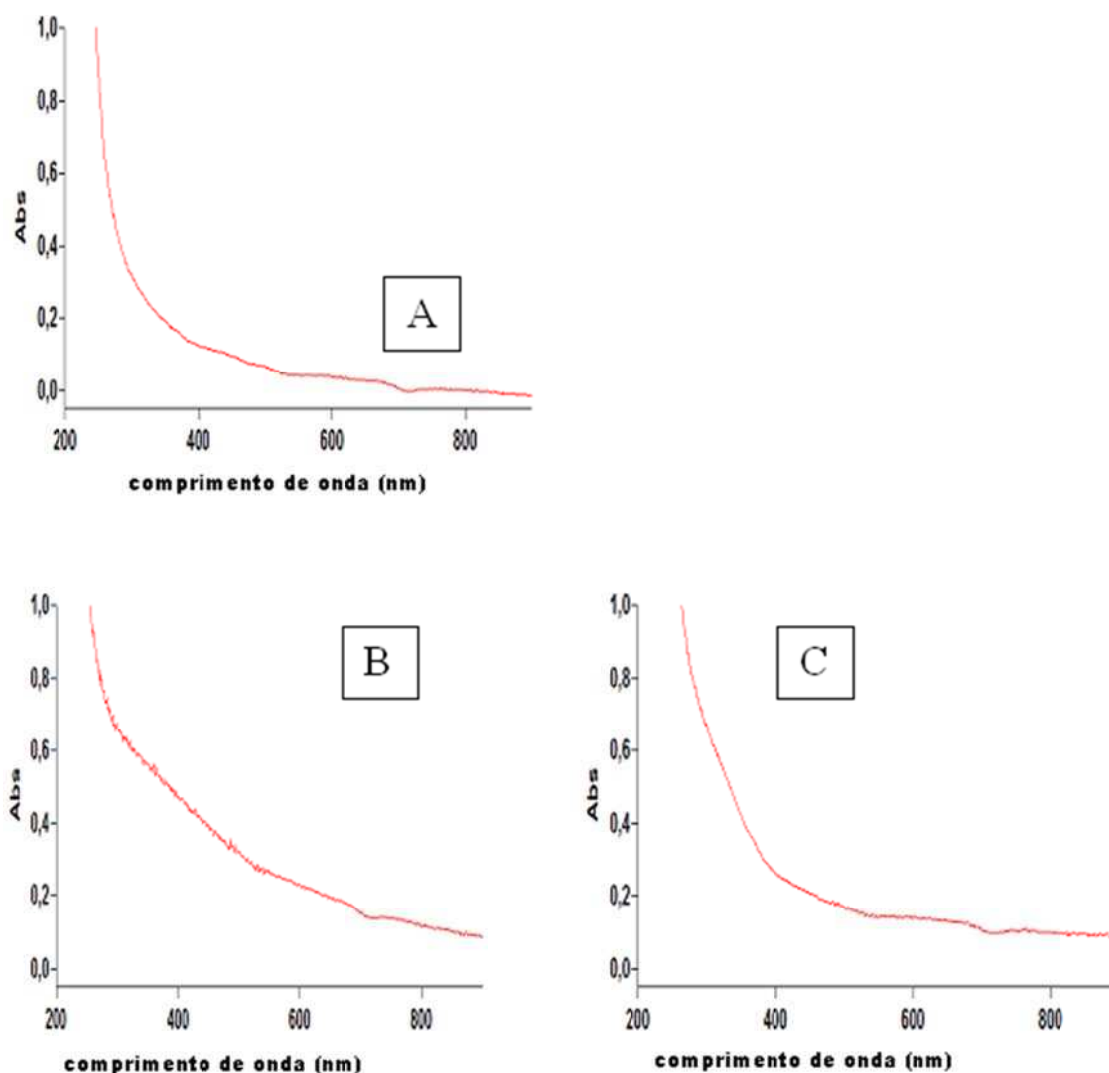


Figura 24: Espectros de ultravioleta e visível (UV-vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o dia (A) com ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 7,0 no 15^o dia (C).

As análises realizadas nas amostras de controle de *T. villosa* (figura 25) mostraram um aumento da absorvância em relação ao comprimento de onda das amostras do 15^o dia, se comparadas com aquelas amostras obtidas no 10^o dia. Isso pode ter ocorrido devido a alguma substância produzida pelo fungo como pigmentos ou outros resíduos derivado do fungo.

Os resultados com o *T. villosa* em presença de ácido fúlvico com pH 3,0 (figura 26) para teste de degradação foram extremamente favoráveis, Minussi et al. (2001) encontrou resultados semelhantes com *T. villosa* onde observou se a atividade de Lcc em placas para descoloração.

Os resultados com o *T. villosa* em presença de ácido fúlvico com pH 3,0 foram significativos, assim como ocorreu com *P. sanguineus* nas mesmas condições. Houve redução maior do espectro no primeiro trecho, que atingiu um índice de percentual de remoção de 52%, já no segundo trecho índice percentual de remoção foi menor onde foi obtido 38%. A redução da absorbância em relação ao comprimento de onda, aconteceu principalmente na região entre 200 e 400 nm. Já na amostra de *T. villosa* em presença de ácido fúlvico de pH 5,0 (figura 27). O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi de 65 % e no segundo trecho o índice percentual foi de 55%.

Nas amostras analisadas de *T. villosa* com ácido de pH 7,0 (figura 28) a redução na absorbância em relação ao comprimento de onda obtiveram um percentual de remoção parecidos com um índice de percentual de remoção no primeiro trecho de 44%, e no segundo trecho de 42%.

Esses resultados podem ocorrer em consequência do pH da solução obtida juntamente com o ácido fúlvico em estudo ou provenientes da quantidade de dias (somente 15 dias) em que o fungo ficou em contato com a solução contendo o ácido a 28° C, o que pode ter melhorado a atuação fúngica no processo de degradação das soluções ácidas em diferentes pHs. Badis et al. (2009) em um dos seus trabalhos com actinomicetos conseguiram a máxima descoloração de água com substâncias húmicas em 28 dias a 30°C com cultura sob agitação.

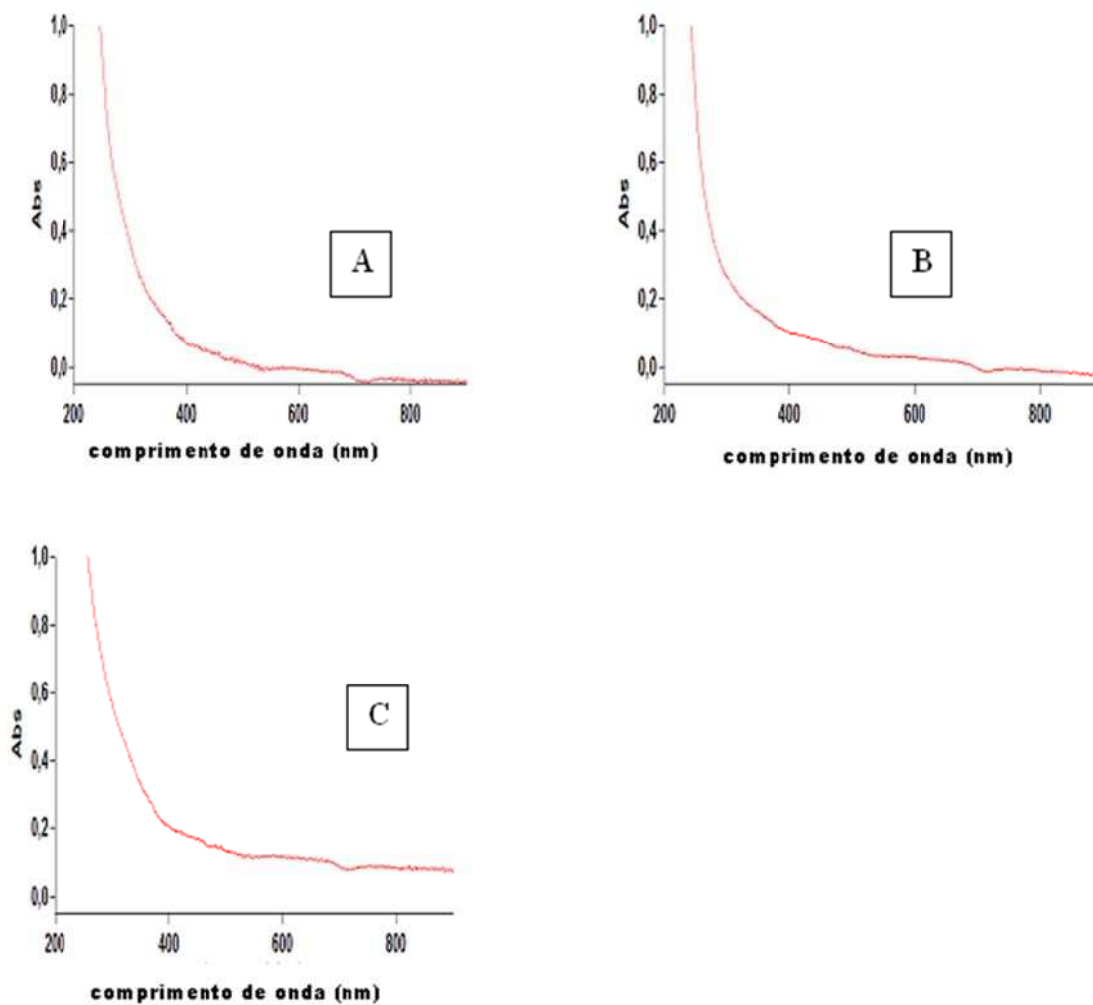


Figura 25: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* para controle sem água no 10 ° dia (A) com água autoclavada no 10 ° dia (B) com água autoclavada 15° dia (C).

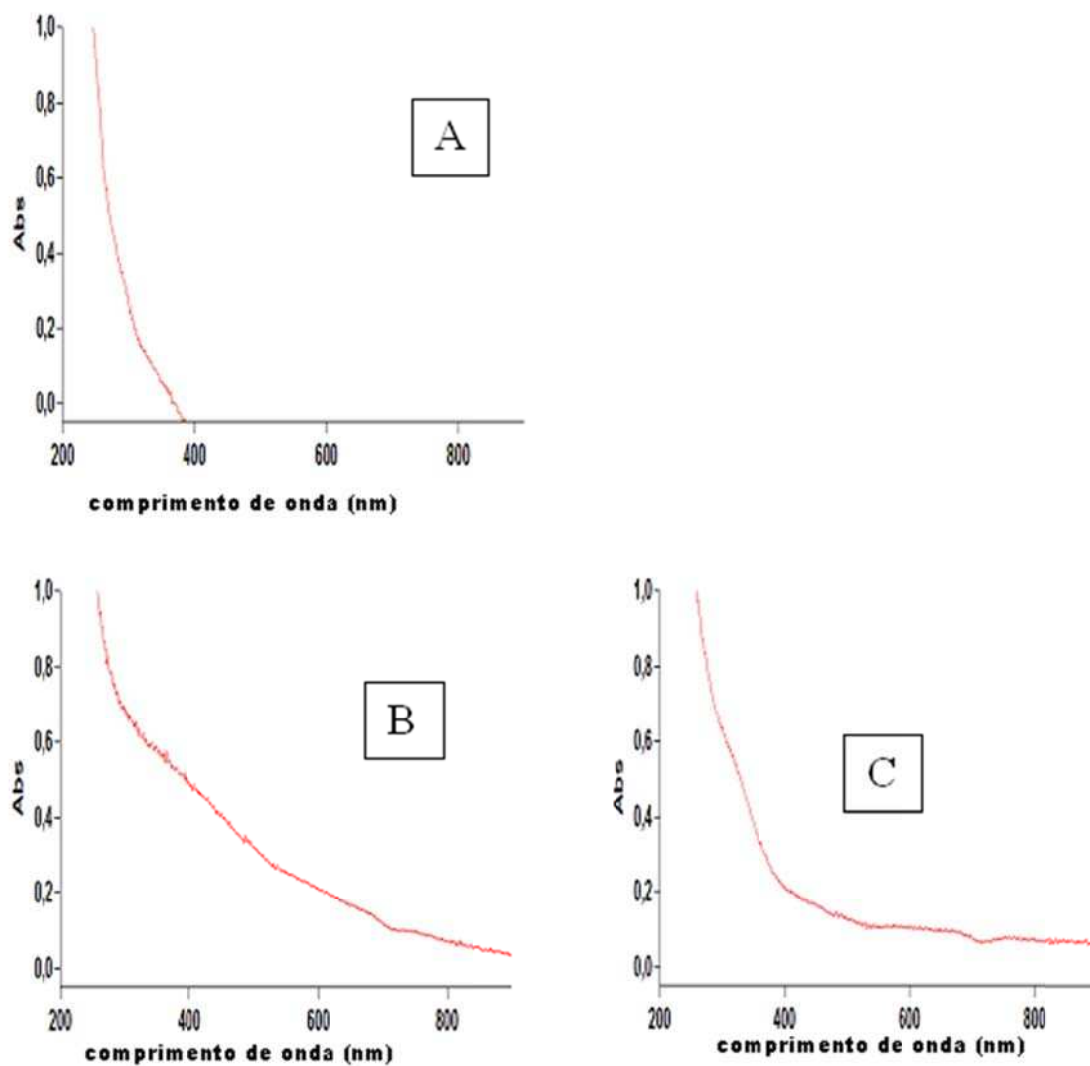


Figura 26: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 3,0 no 10^o dia (A) com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10^o dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 3,0 no 15^o dia (C).

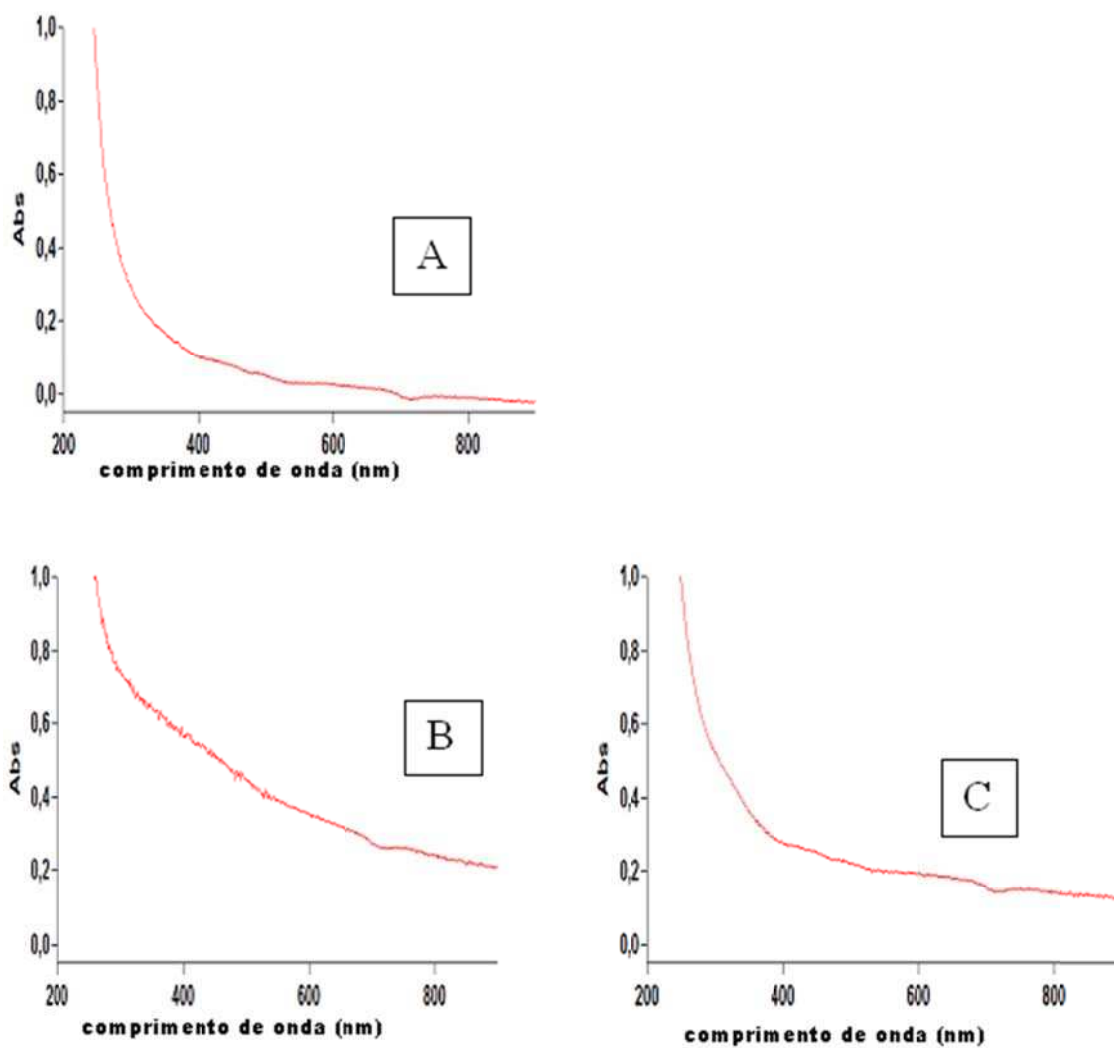


Figura 27: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 5,0 no 10^o dia (A) com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10^o dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 5,0 no 15^o dia (C).

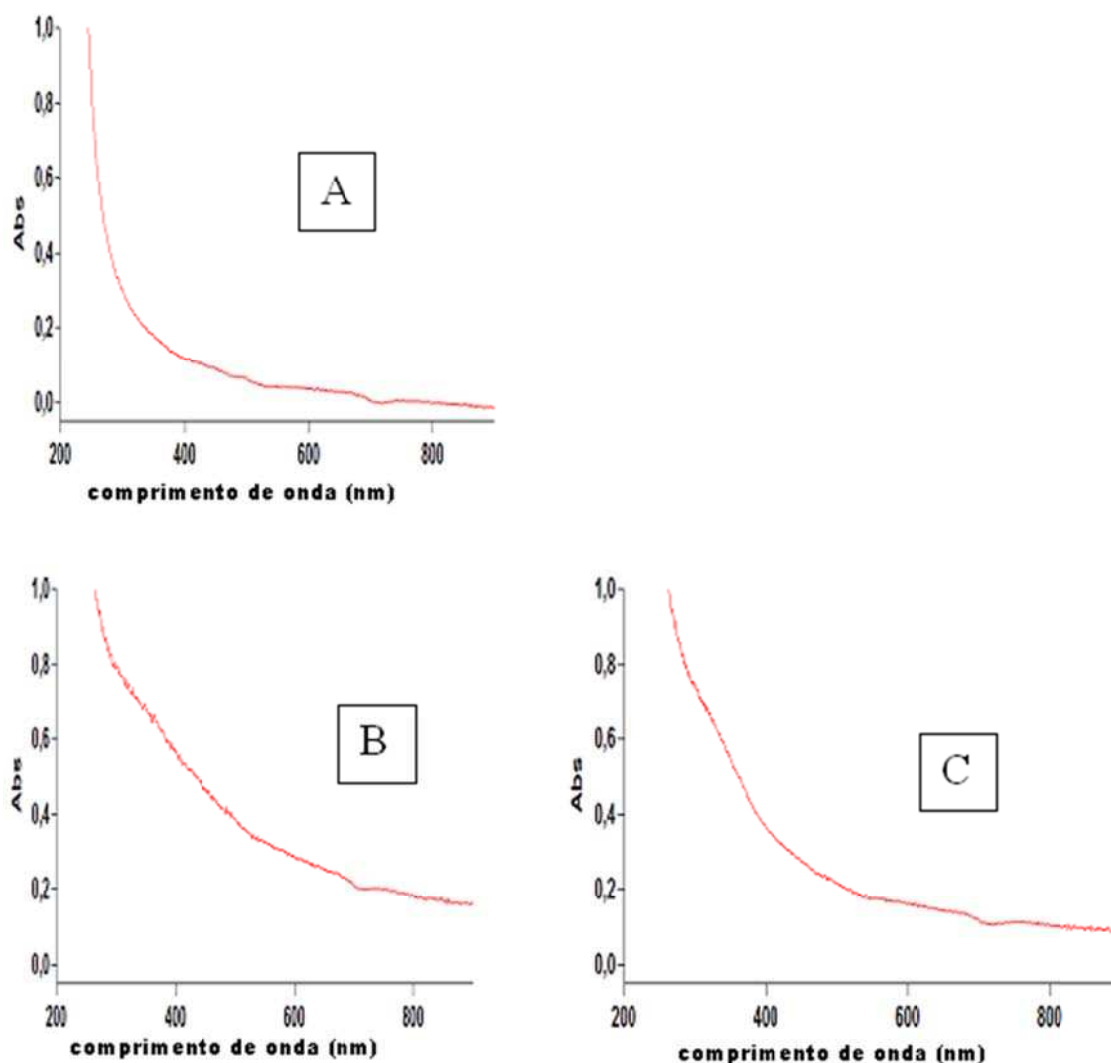


Figura 28: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (A) com ácido fúlvico em pH 7,0 no 10 ° dia (B) e com a presença de ácido fúlvico em pH 7,0 no 15° dia (C).

Os fungos de decomposição branca poderiam aumentar sua produção enzimática, caso ficassem em um maior período em contato com as SHs, pois seria permitido uma maior adaptabilidade destes fungos ao substrato. Segundo Onneby, Jonsson e Stenstrom (2010), provaram em seus estudos que a degradação pode ser total, quando os microrganismos estão adaptado ao ambiente, daí a importância do isolamento dos microrganismos de locais contaminados, com as substâncias que se pretende estudar.

6.2.8 Análises de ultravioleta e visível para as amostras de fungos em presença de ácido húmico e as correlações com a suas produções enzimáticas.

Para interpretação dos resultados, as análises das amostras do 10º dia em presença dos ácidos húmicos da Sigma-Aldrich® e extraído foram comparados com as análises espectrofotométrica do 15º dia. Este método de comparação serve como medida indireta de degradação pois se há a diminuição da absorbância em relação ao comprimento de onda há indícios da diminuição de cor e conseqüentemente da degradação das substâncias em estudo. Assim como Badis et al. (2009) que em seu trabalho com substâncias húmicas compararam as estruturas iniciais e finais de SHAs após incubação (28 dias), e com as mudanças estruturais no espectro e produtos metabólito analisados por HPLC. Os espectros foram utilizados como indicativos da capacidade de actinomicetos em degradar substâncias húmicas e desempenhar um papel na degradação da lignina e diminuir o volume de húmus em solos locais.

Os resultados das análises de Ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras contendo o *P. sanguineus* (figura 29) em presença de ácido húmico da Sigma-Aldrich® para teste de absorbância se mostraram favoráveis, havendo mudança nos espectros do 10º para o 15º dia, havendo uma redução da absorbância em relação ao comprimento de onda das regiões do UV como também da região visível, de forma suave sem nenhuma queda brusca da absorbância. O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi de 44%, e de 38% no segundo trecho.

Esses resultados já eram esperados, pois há muitos relatos na bibliografia, sobre a capacidade degradativa destes fungos e principalmente de *P. sanguineus*, como no estudo de Machado et al. (2006) estudaram a capacidade degradativa de corantes de indústria têxtil por basidiomicetes, e apontou *Trametes versicolor* e *P. sanguineus* como alternativas na biorremediação de cor de efluentes.

Já em presença do ácido húmico extraído (figura 30) a diminuição no espectro da absorbância do 10º para o 15º dia ocorreu entre as regiões 400 a 800 nm. O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi insignificante, já que este índice apresentou um valor menor que 1%, sendo maior no segundo trecho onde foi obtido um índice percentual de 42%. Isso condiz com a produção enzimática da Lcc do 10º dia que foi mais alta nas amostras que receberam o ácido húmico da Sigma-Aldrich®.

Pelos resultados estatísticos fica claro que tanto a LiP como a MnP não interferiram nestes resultados, já que sua produção foi muito baixa em todos os testes, principalmente nos ensaios com os ácidos húmicos.

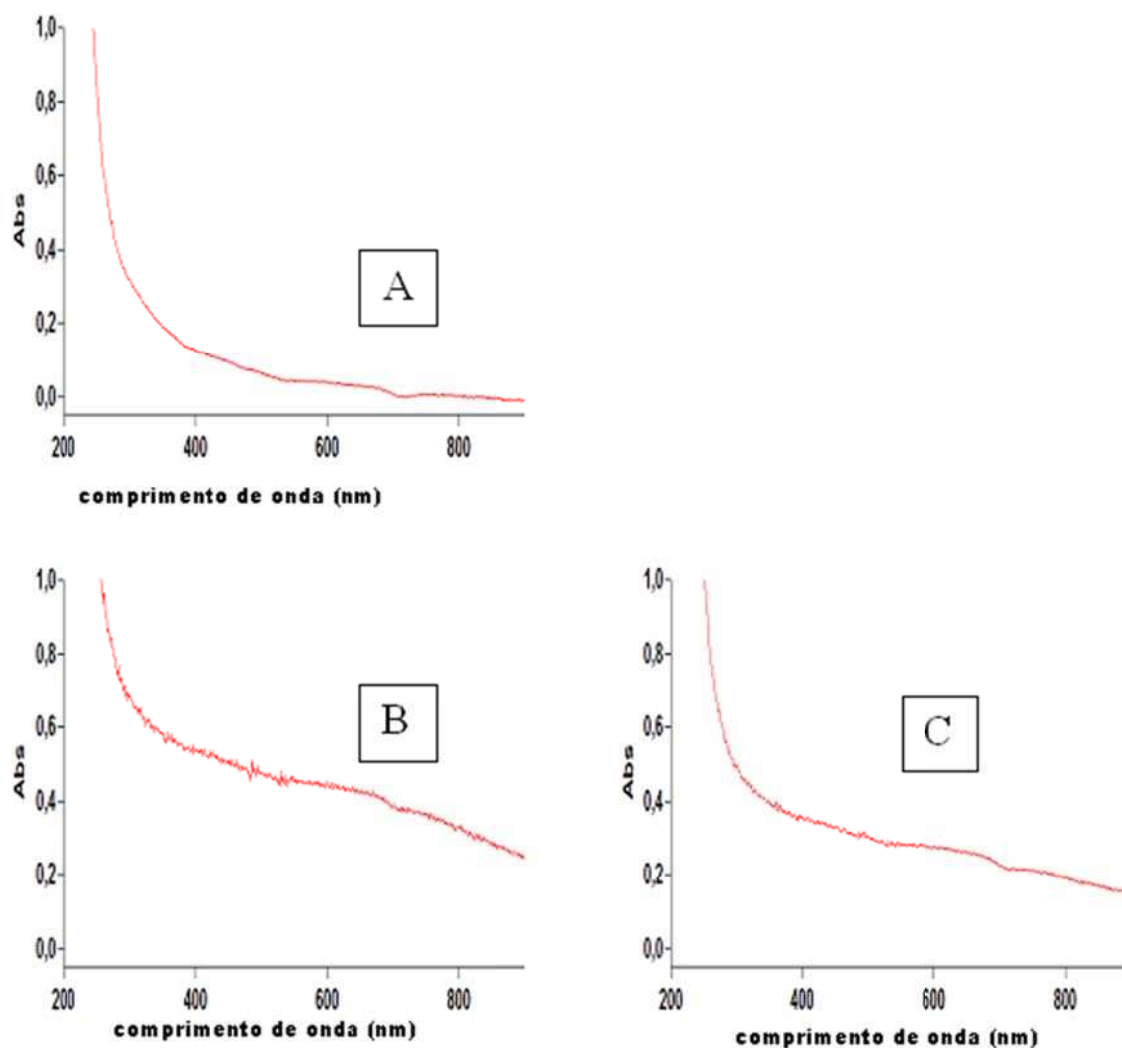


Figura 29: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem o ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (A) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10 ° dia (B) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 15° dia (C).

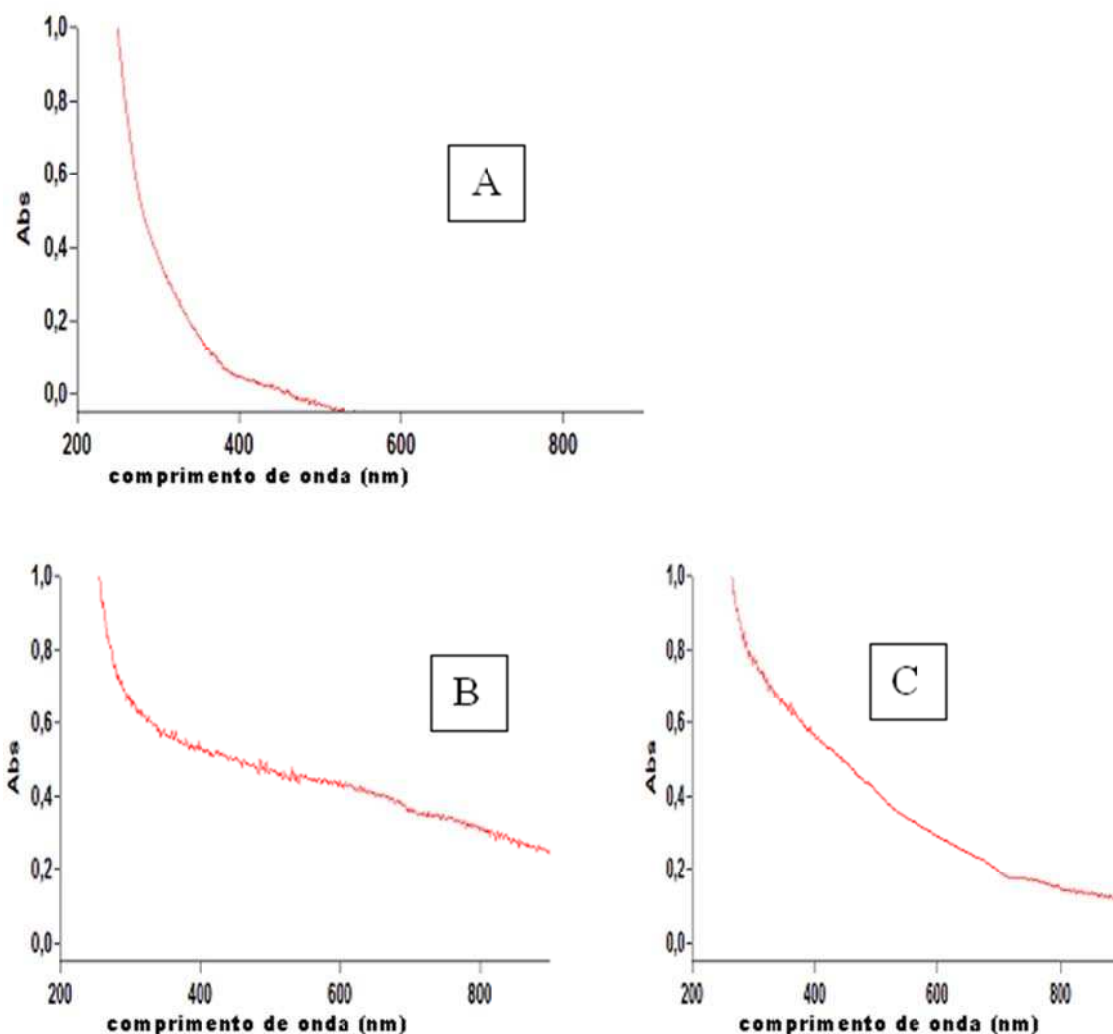


Figura 30: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* sem ácido húmico extraído no 10^o dia (A) com ácido húmico extraído no 10^o dia (B) com ácido húmico extraído no 15^o dia (C).

Nos resultados das análises de ultravioleta e visível de *T. villosa* (figura 31, 32) em presença de ácido húmico da Sigma-Aldrich® para teste de remoção se mostraram satisfatórios assim como a produção enzimática do 10^o das amostras deste fungo. O desempenho na diminuição da absorvância em relação ao comprimento de onda em presença do ácido húmico da Sigma-Aldrich® e em presença do ácido húmico extraído foram satisfatórias, pois é possível verificar nos espectros do 10^o para o 15^o dia uma queda considerável na absorvância em função do comprimento de onda, principalmente na região do segundo trecho que corresponde 400 a 800 nm. O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi de 17% e de 56% no segundo trecho.

As amostras de *T. villosa* com o ácido húmico extraído (figura 32) obtiveram uma diminuição notável da absorbância nos espectros do 10^o para o 15^o dia. E como o relatado com o ácido húmico da Sigma-Aldrich®, houve uma diminuição considerável no segundo trecho maior que no primeiro. Os Resultados foram compatíveis com a produção enzimática da Lcc obtidas na produção enzimática do 10^o dia. O índice de percentual de remoção no primeiro trecho foi de 33% e de 42% no segundo trecho.

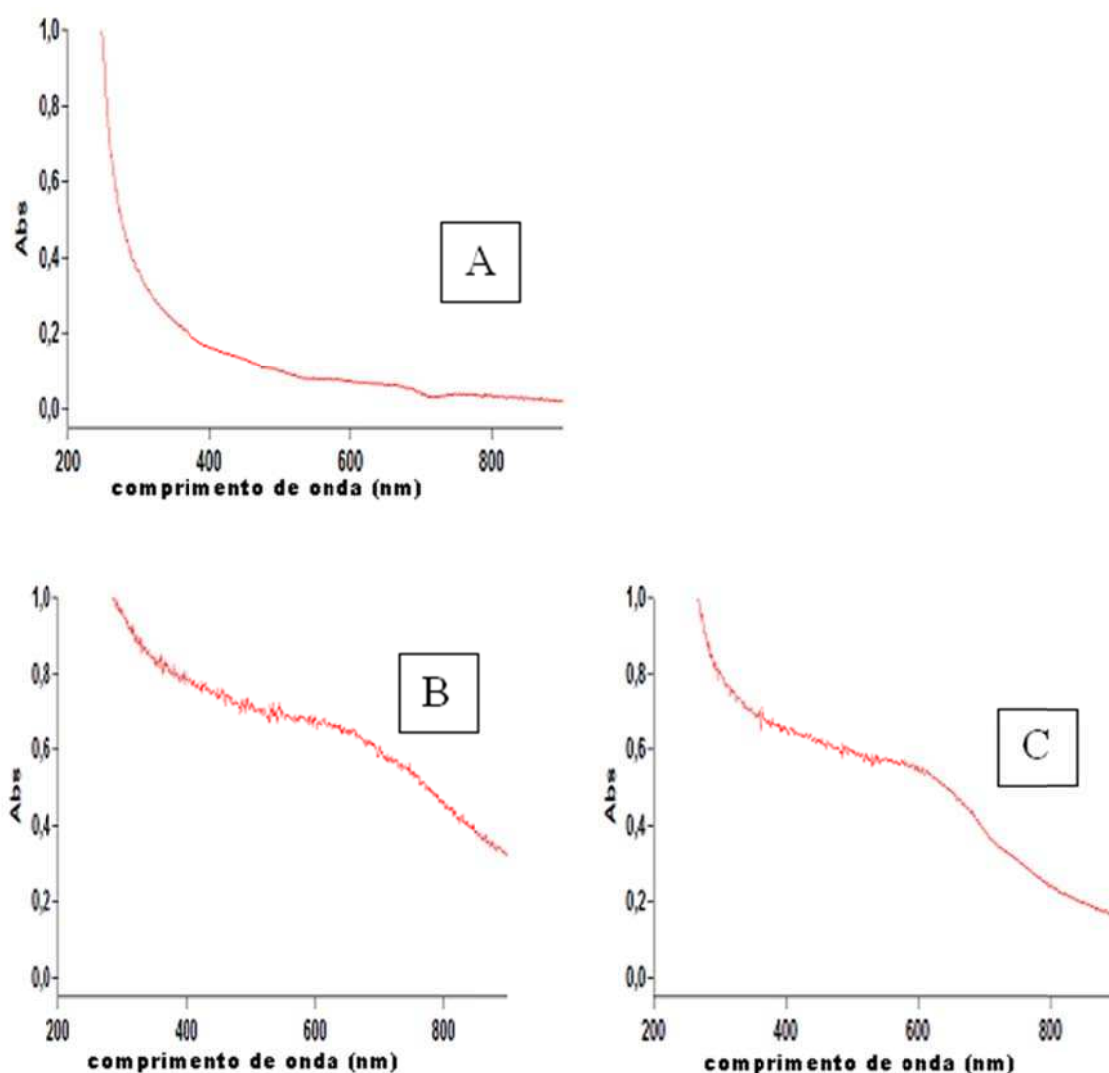


Figura 31: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10^o dia (A) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10^o dia (B) com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 15^o dia (C).

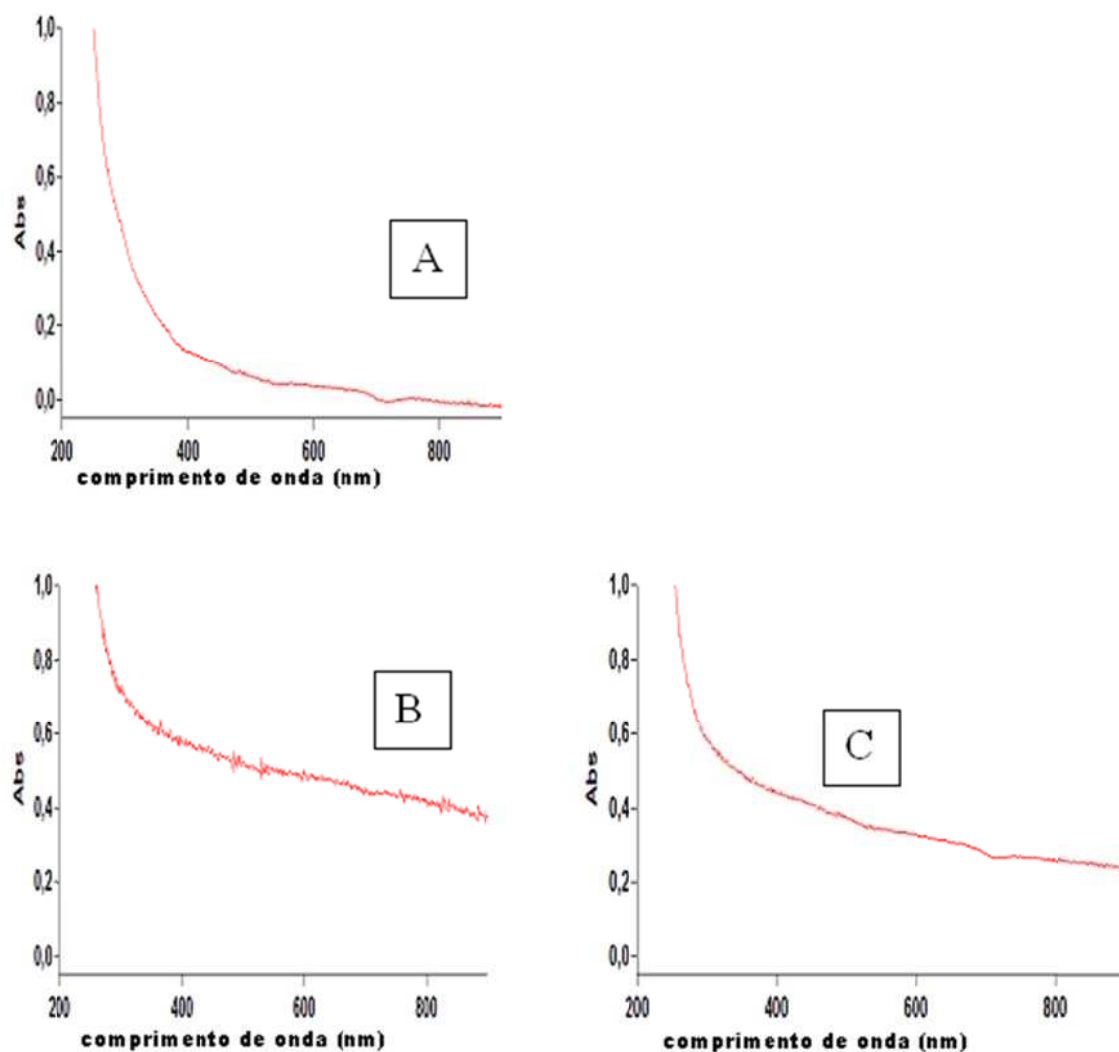


Figura 32: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* sem o ácido húmico extraído no 10 ° dia (A) com ácido húmico extraído no 10 ° dia (B) com ácido húmico extraído no 15° dia (C).

6.2.9 Teste de adsorção por *T. villosa* e *P. sanguineus* com o ácido fúlvico

Os testes de adsorção foram realizados com intuito de verificar se os fungos em estudos degradaram ou adsorveram os ácidos húmicos e fúlvicos durante os ensaios, pois conforme estudos de Silva e Fay (2004), o processo de degradação depende dos microrganismos envolvidos e são diferentes as reações e transformações catalisadas por estes. Com o processo de autoclavação realizados nos ensaios foi possível paralisar essas reações que promovem a degradação e por isso sendo necessário o teste de

adsorção como contraprova de que o fungo adsorveu e não se utilizou da atividade enzimática para a degradação dos ácidos húmicos e fúlvicos.

Todos os testes de adsorção foram feitos com fungos que cresceram e no 10º dia foram levados a autoclave. Os gráficos abaixo obtidos a partir do exame de ultravioleta e visível de *P. sanguineus* para o pH 3,0 mostram que não houve grande adsorção, pois ao observar a figura 33, no 10º e 15º dia nota-se pequena diminuição na absorvância em função do comprimento de onda, neste caso o ácido em estudo era o ácido fúlvico. o índice de percentual de adsorção no primeiro trecho foi de 6% e de 13% no segundo trecho.

Claus e Filip (1998) em seu trabalho com degradação das substâncias húmicas com fungos obtiveram resultados com até 60% de capacidade de degradação das substâncias húmicas. No entanto, a exata quantificação do grau de degradação foi difícil por causa da adsorção da matéria húmica em micélio dos fungos.

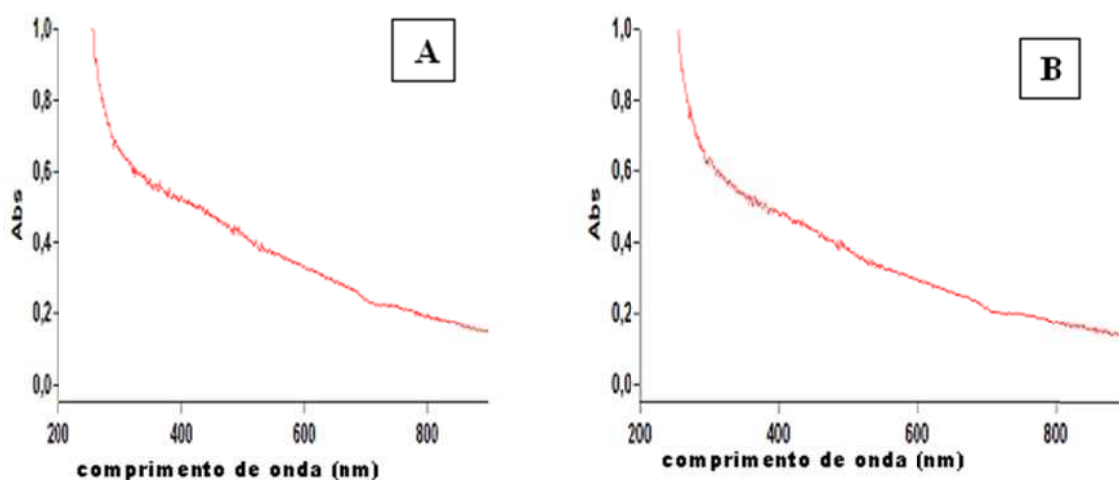


Figura 33: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido fúlvico em pH 3,0 no 10º(A) e 15º(B) dia respectivamente.

Para as amostras de *T. villosa* nas mesmas condições houve uma redução maior na absorvância em função do comprimento de onda. O índice de percentual de adsorção foi um pouco maior no primeiro trecho onde foi encontrado 43% e de 40% no segundo trecho (figura 34).

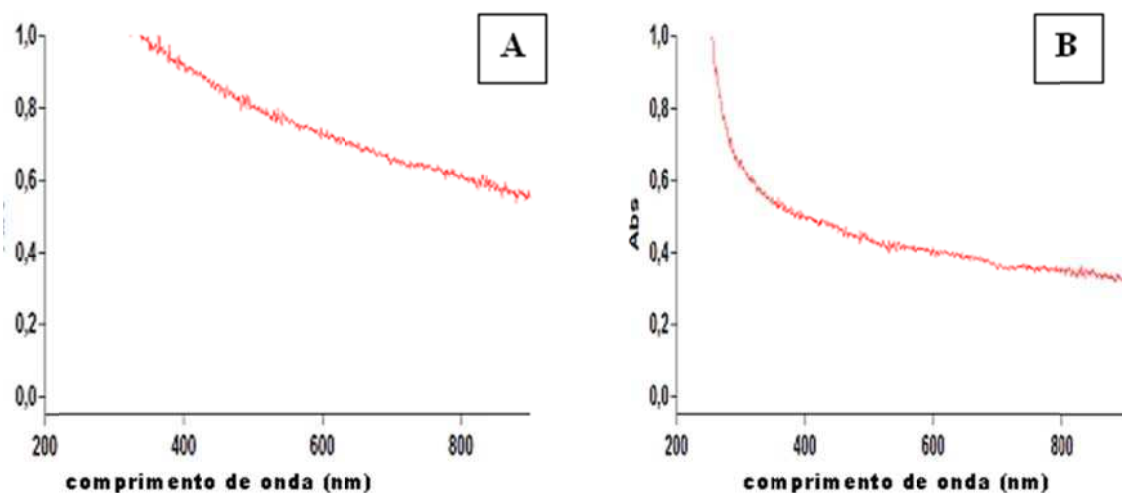


Figura 34: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 3,0, no 10^o e 15^o dia respectivamente.

Diferente do que aconteceu as amostras de *P. sanguineus* com ácido fúlvico em pH 3,0 para o teste de adsorção as amostras de *P. sanguineus* com ácido fúlvico em pH 5,0 apresentaram uma redução da absorvância em relação ao comprimento de onda, mas somente no primeiro trecho, conforme figura 35. O índice de percentual de adsorção no primeiro trecho foi de 40%.

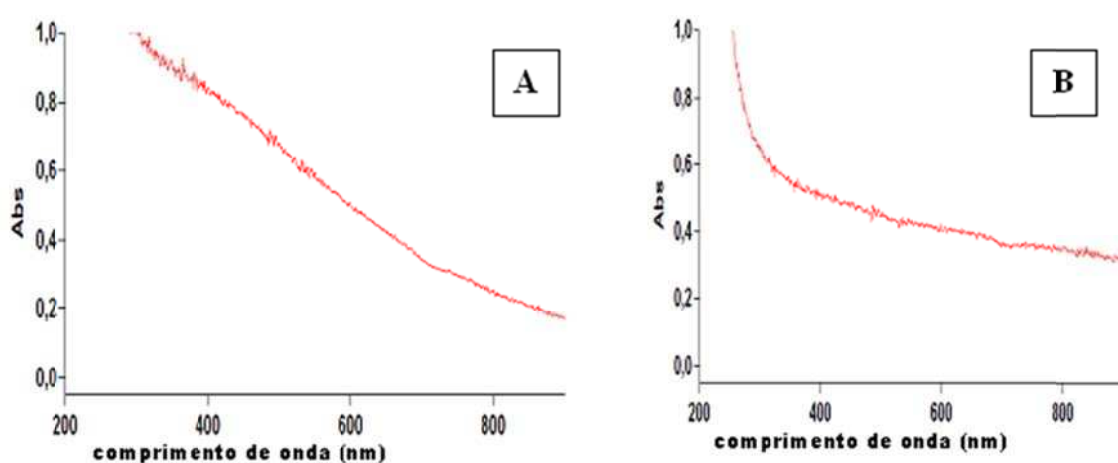


Figura 35: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 5,0, no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente.

Nos resultados dos espectros das amostras de *T. villosa* em presença de ácido fúlvico em pH 5,0 para o Teste de Adsorção percebe-se que houve redução da absorvância em relação ao comprimento de onda na da região do UV e também na região visível. O índice de percentual de adsorção foram matematicamente iguais, sendo 67% no primeiro trecho e 68% no segundo trecho. A figura 36 mostra as diferenças entre o gráfico da amostra do 10º dia com o gráfico do 15º dia.

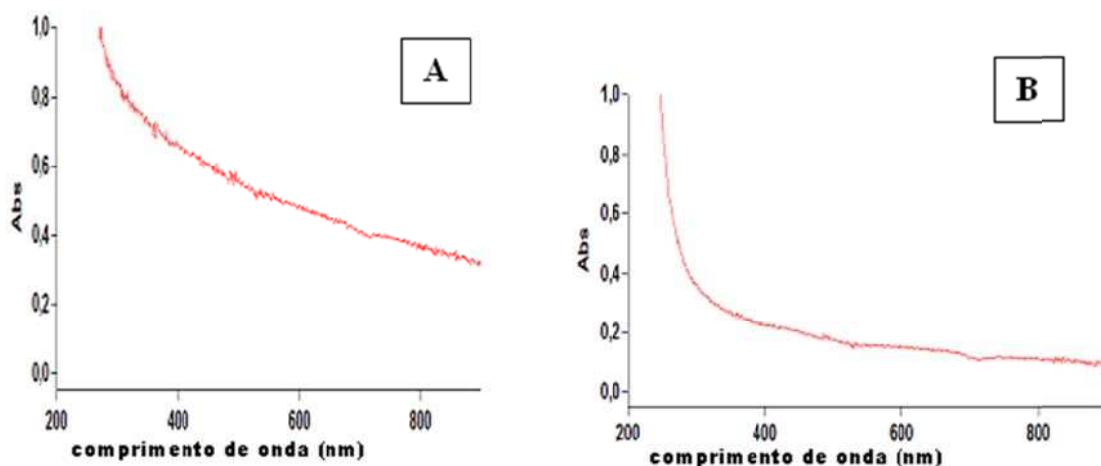


Figura 36: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido fúlvico em pH 5,0 no 10º(A) e 15º(B) dia respectivamente.

Para as amostras de *P. sanguineus* autoclavado no 10º dia e depois colocado em presença de ácido fúlvico em pH 7,0 (figura 37) a adsorção aconteceu, mas não tão evidente como a que ocorreu na amostra do mesmo fungo autoclavado no 10º dia e que recebeu o ácido fúlvico em pH 5,0. O índice de percentual de adsorção no primeiro trecho foi de 26% e não foi significativo no segundo trecho, pois percentual de adsorção não atingiu a 1%.

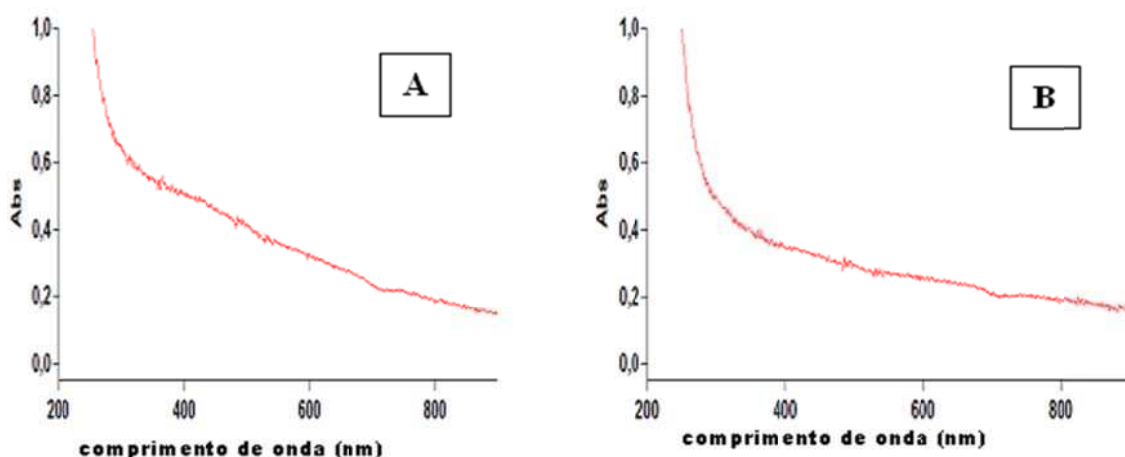


Figura 37: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o e 15^o dia respectivamente.

A figura 38, mostra gráficos de espectro de *T. villosa* autoclavado em pH 7,0, onde a diminuição do espectro da absorbância em relação ao comprimento de onda, foi baixa, onde foi encontrado um índice de percentual de adsorção de somente 15% no primeiro trecho foi de 13% no segundo trecho.

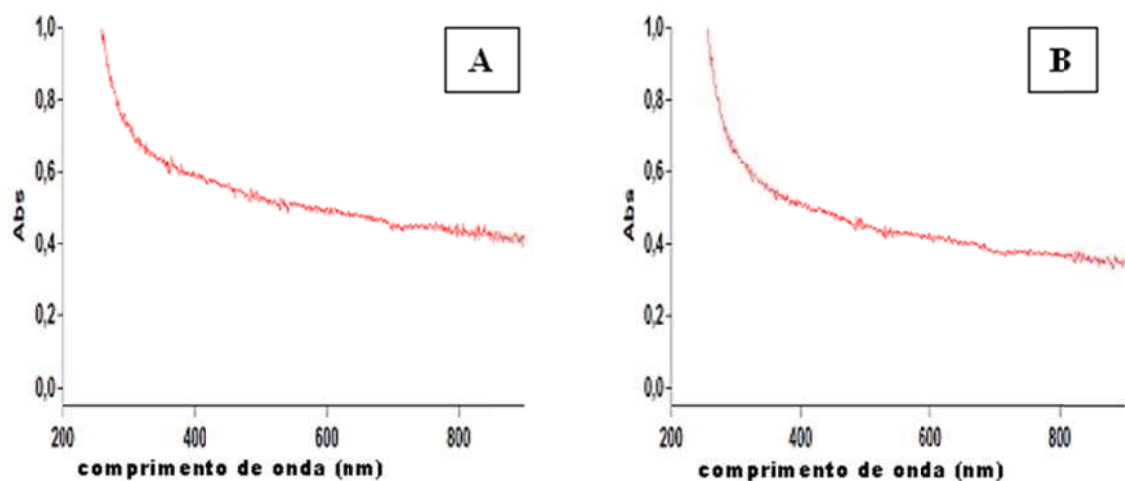


Figura 38: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado e adicionado o ácido fúlvico em pH 7,0 no 10^o(A) e 15^o(B) dia respectivamente

Os resultados conforme mostram as figuras 35 e 36, onde o ácido fúlvico em pH 5,0 tanto em presença do *P. sanguineus* como de *T. villosa* é mais facilmente adsorvido pela massa fúngica.

Todos estes espectros mostram que houve pequena adsorção. Ao contrário dos espectros realizados para teste de adsorção os espectros realizados sem a autoclavação, mostram uma maior diminuição na absorbância combinados com uma maior atividade enzimática, pois conforme Rezende (2005) o potencial de biodegradação dos microrganismos está relacionado à sua atividade enzimática. E segundo Machado et al. (2005), os fungos de decomposição branca degradam devido à produção de um sistema multienzimático, como as enzimas Lcc, LiP e MnP; aqui analisadas nos ensaios. Enzimas estas que não estavam presentes nos testes de adsorção devido ao processo de esterilização utilizando a autoclave.

6.2.10 Teste de adsorção por *P. sanguineus* e *T. villosa* com o ácido húmico da Sigma-Aldrich® e o ácido húmico extraído

As figura 39 a 42 mostram gráficos obtidos dos espectros de *P. sanguineus* e *T. villosa* ambos autoclavados; as primeiras em presença de ácido húmicos da Sigma-Aldrich® e as demais com o ácido húmico extraído.

Em alguns dos casos não houve diminuição da absorção em função do comprimento de onda do 10º dia para o 15º dia, havendo um pequeno aumento da absorbância em relação ao comprimento de onda. Ao retirar a amostra da autoclave percebeu-se que toda massa fúngica se desfez, provavelmente o calor tenha desfeito algumas ligações macromoleculares da massa fúngica e liberado alguns resíduos, seria uma hipótese, já que esta situação ao ser avaliada no espectro causaria dificuldade na passagem da luz interferindo nos resultados. O que provavelmente ocasionou o aumento na absorbância em função do comprimento de onda. Como o que ocorreu nas figuras 39, 41, 42.

Só houve adsorção nas amostras de *T. villosa* autoclavado com ácido húmico da Sigma-Aldrich® onde foi encontrado um índice de percentual de adsorção de 26% no primeiro trecho e de 35% no segundo trecho como mostrado na figura 40.

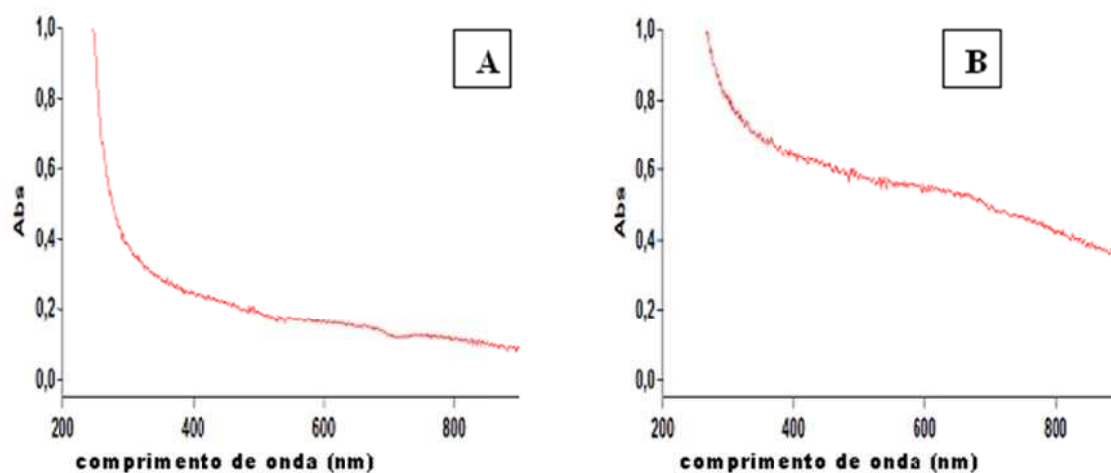


Figura 39: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10°(A) e 15°(B) dia respectivamente

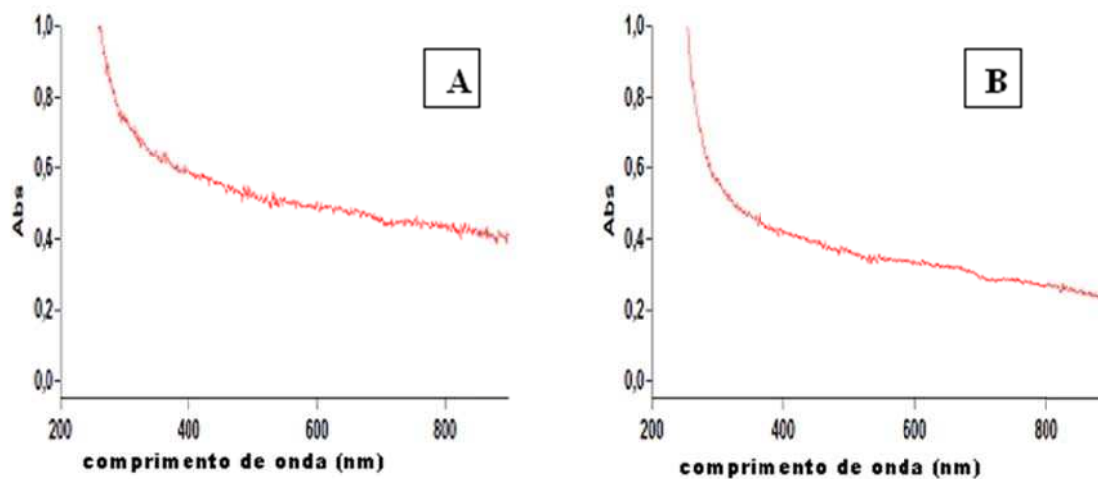


Figura 40: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido húmico da Sigma-Aldrich® no 10°(A) e 15°(B).

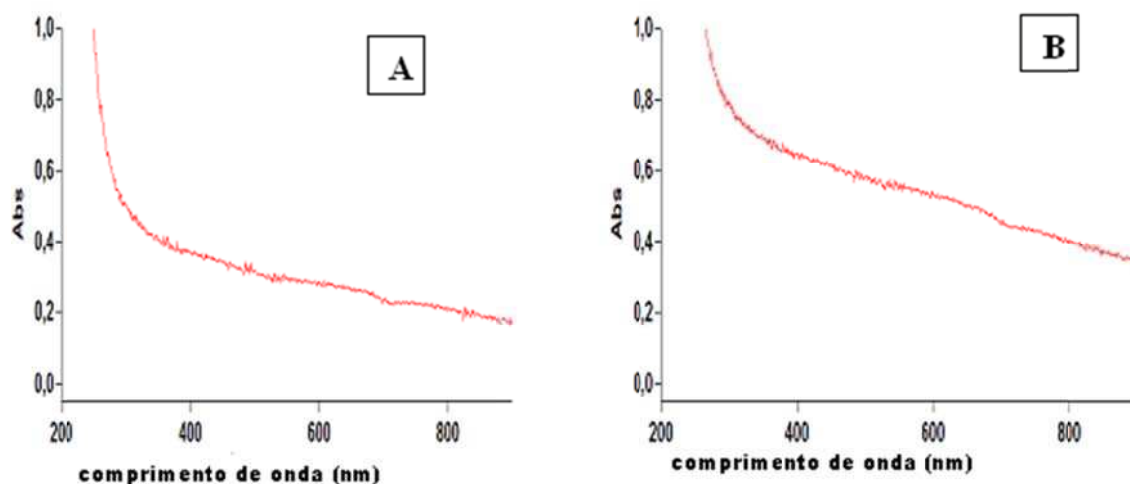


Figura 41: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnoporus sanguineus* autoclavado com ácido húmico extraído no 10°(A) e 15°(B).

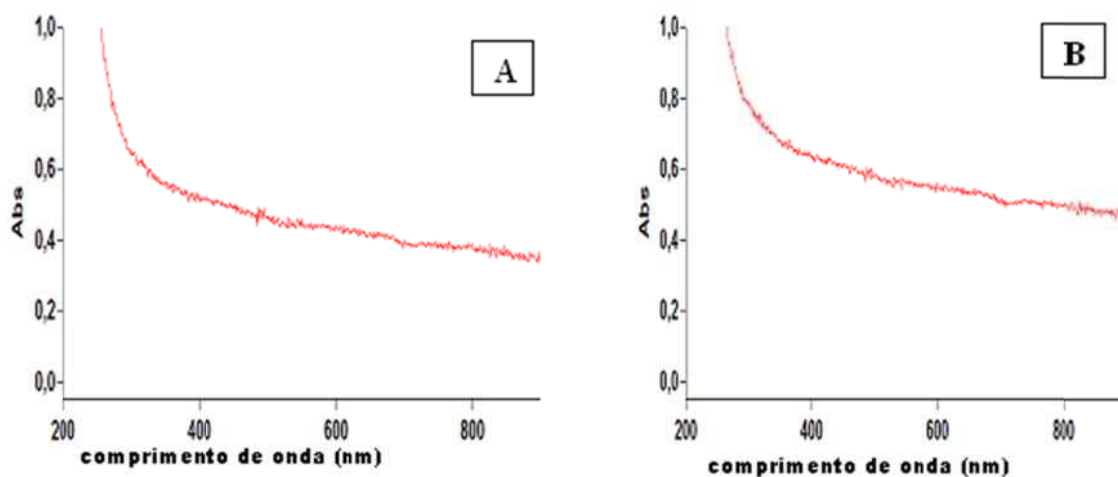


Figura 42: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* autoclavado com ácido húmico extraído no 10°(A) e 15°(B).

6.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E A UTILIZAÇÃO DO REATOR ESTÁTICO (JAR TEST)

6.3.1 Resultado da produção enzimática com a utilização do reator estático (Jar Test) das amostras de *P. Sanguineus* e *T. villosa*

Todas as análises estatísticas descritivas da produção enzimática de *P. sanguineus* e *T. villosa* na utilização em reator estático (Jar Test) encontram-se no Apêndice A.

A produção de Lcc (figura 43) pelo *P. sanguineus* na utilização do Jar Test com o ácido fúlvico no 10º dia foi de 1,84 U.mL⁻¹, esse valor foi o maior que aquele produzido pelas mesmas cepas nos ensaios com o ácido fúlvico na incubadora agitadora Shaker. Já a produção enzimática da LiP e MnP (figura 43) produzidos por *P. sanguineus* foram baixos assim como outros resultados obtidos nos outros ensaios para o ácido fúlvico e húmico. A produção enzimática de Lcc pelo *P. sanguineus* para o ensaio com o ácido húmico em reator estático foi maior com 2,84 U.mL⁻¹ (figura 44).

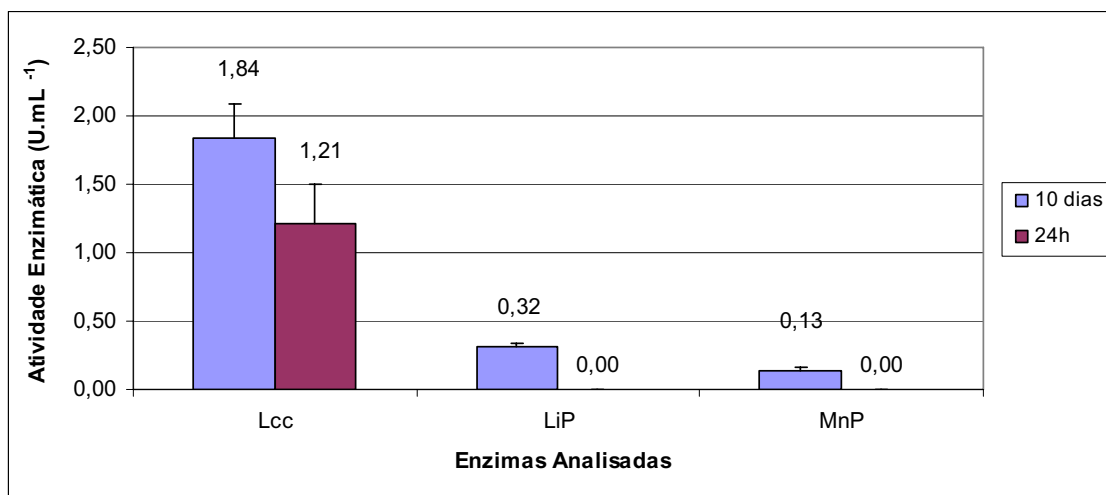


Figura 43: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Pycnoporus sanguineus* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido fúlvico.

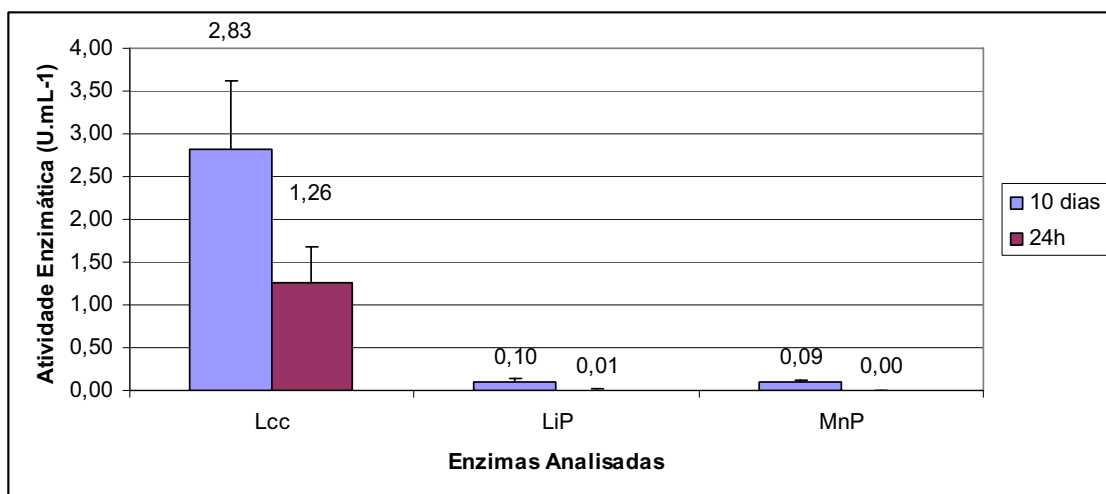


Figura 44: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Pycnoporus sanguineus* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido húmico.

Já a produção enzimática de Lcc *T. villosa* (figura 45) para ensaios com o ácido fúlvico no 10º dia foi de 2,12 U.mL⁻¹ esse valor foi um pouco maior que aquele produzido pelas mesmas cepas nos ensaios do ácido húmico no Jar Test de 2,02 U.mL⁻¹.

Se comparados com outros trabalhos que se utilizaram de indutores, a produção obtida em nosso trabalho foi baixa, talvez devido à grande diluição do meio de cultura utilizado. As Lccs extracelulares de basidiomicetos são produzidos apenas em pequenas quantidades. Portanto, é importante aumentar a produtividade do processo quando sua utilização é voltada a potenciais aplicações industriais (FLORES et al., 2009)

As produções enzimáticas da LiP e MnP produzidos também foram baixas (figura 45). A produção enzimática da Lcc nos ensaios com *T. villosa* com o ácido húmico (figura 46) no 10º dia foi de 2,02 U.mL⁻¹.

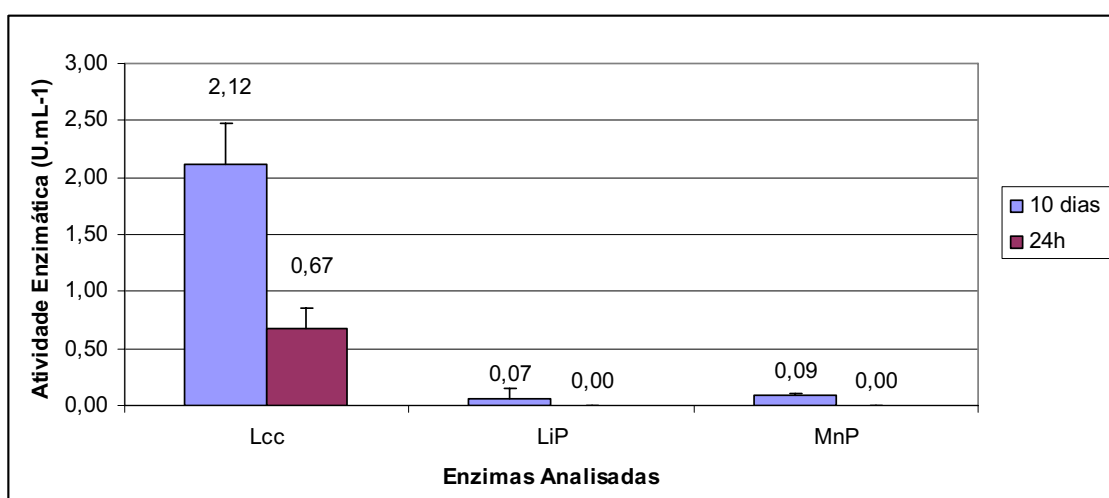


Figura 45: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Trametes villosa* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido fúlvico.

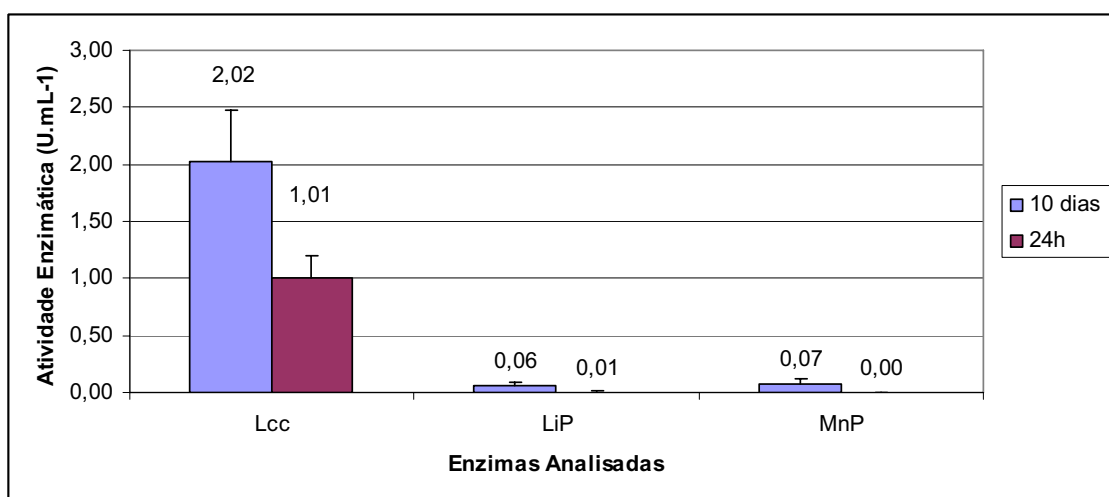


Figura 46: Determinação das atividades enzimáticas (U.mL⁻¹) de *Trametes villosa* de todas as amostras do 10º dia e 24h nos testes com o ácido húmico.

Em todos os experimentos no reator estático (Jar Test) é possível notar também a queda da produção enzimática após 24 horas do fungo em contato com os ácidos. Esta queda foi notada nos ensaios com o ácido húmico no Jar Test como também com o ácido fúlvico. Nos estudos de Hirai et al. (2004), as enzimas lignolíticas de fungos de decomposição branca, são promissoras na degradação de xenobióticos. Esses autores verificaram com a enzima extracelular MnP, na presença de mediadores enzimáticos uma remoção de 60% da concentração inicial em 24 horas de tratamento, sendo este o melhor tratamento alcançado na sua pesquisa, mas no entanto foi notada a formação de metabolitos, o que não é interessante no tratamento de água, pois os mediadores enzimáticos podem ser tóxicos e ocasionar problemas nas etapas seguintes ao tratamento se as enzimas forem utilizadas para o pré-tratamento.

6.3.2 Resultados de espectrofotometria de Ultravioleta e visível (UV-vis) dos experimentos em reator estático (Jar Test)

Nos espectros obtidos a partir do exame de UV-vis de *T. villosa* e de *P. sanguineus* com o ácido fúlvico nos experimentos no Jar Test (figuras 48, 49) nota-se diminuição na absorvância em função do comprimento de onda, neste caso o ácido em estudo era o ácido fúlvico.

A diminuição da absorvância em função do comprimento de onda dos espectros de *P. sanguineus* em presença de ácido fúlvico, pode ser visto e comprovado através da diminuição da “cor” da água, cor esta provocada pela presença de ácido fúlvico também observada a olho nu durante a utilização do reator estático (Jar Test) e pelas fotografias obtidas (figura 47).

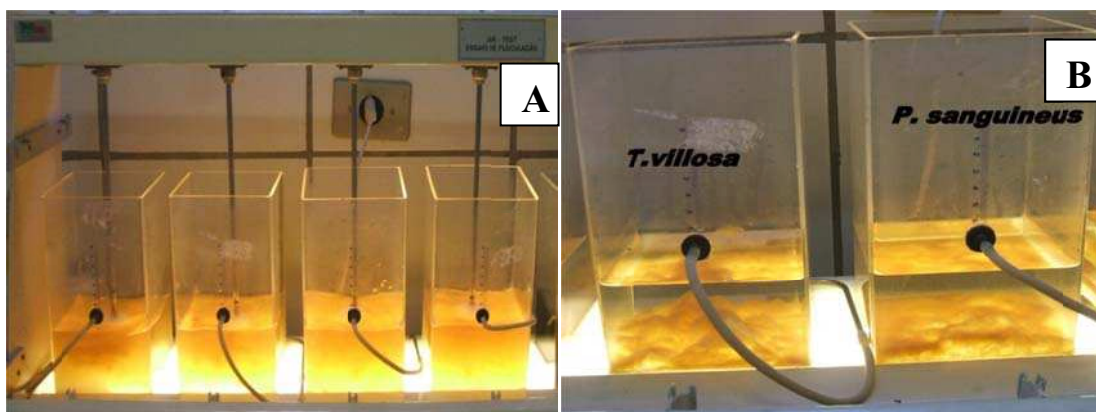


Figura 47: Fotografias da utilização do Jar Test contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico e *Pycnoporus sanguineus*; (A) os dois primeiros jarros são de *Trametes villosa*, e os dois últimos de *Pycnoporus sanguineus* (A) – fotografia da utilização do Jar Test (B) fotografias do final do uso do Jar Test (30 min. depois do início do experimento) o primeiro jarro com as amostras de *Trametes villosa* e o segundo com amostras contendo *Pycnoporus sanguineus*.

Conforme figura abaixo as amostras de *P. sanguineus* com ácido fúlvico obtiveram um índice percentual de remoção no primeiro trecho de 53% em comparação com as amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, também foi encontrado um índice percentual de remoção de 76% no primeiro trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Já no segundo trecho os índices de remoção foram de 42% em comparação com as amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, e de remoção de 92% no segundo trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Resultados apresentados na figura 48.

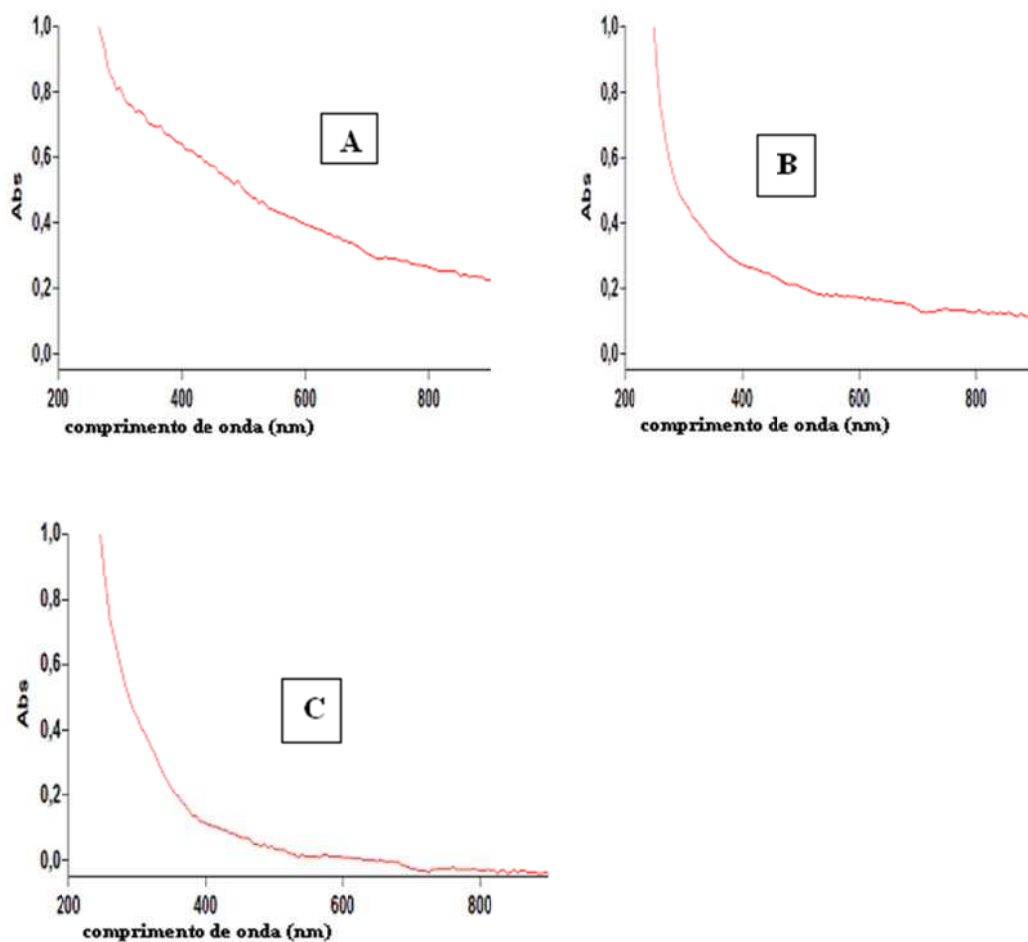


Figura 48: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnopus sanguineus* com ácido fúlvico no 10º dia, após a utilização do reator estático (Jar Test) (A), após 10 min. da finalização dos experimentos (B) e 24 horas após o finalização dos experimentos com o reator estático (Jar Test) (C).

As amostras de *T. villosa* com o ácido fúlvico, obtiveram um índice percentual de remoção no primeiro trecho de 44% em comparação com as amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, também foi encontrado um índice percentual de remoção de 67% no primeiro trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Já no segundo trecho os índices de remoção foram de 43% em comparação com as amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, e de remoção de 71% no segundo trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Resultados apresentados na figura 48.

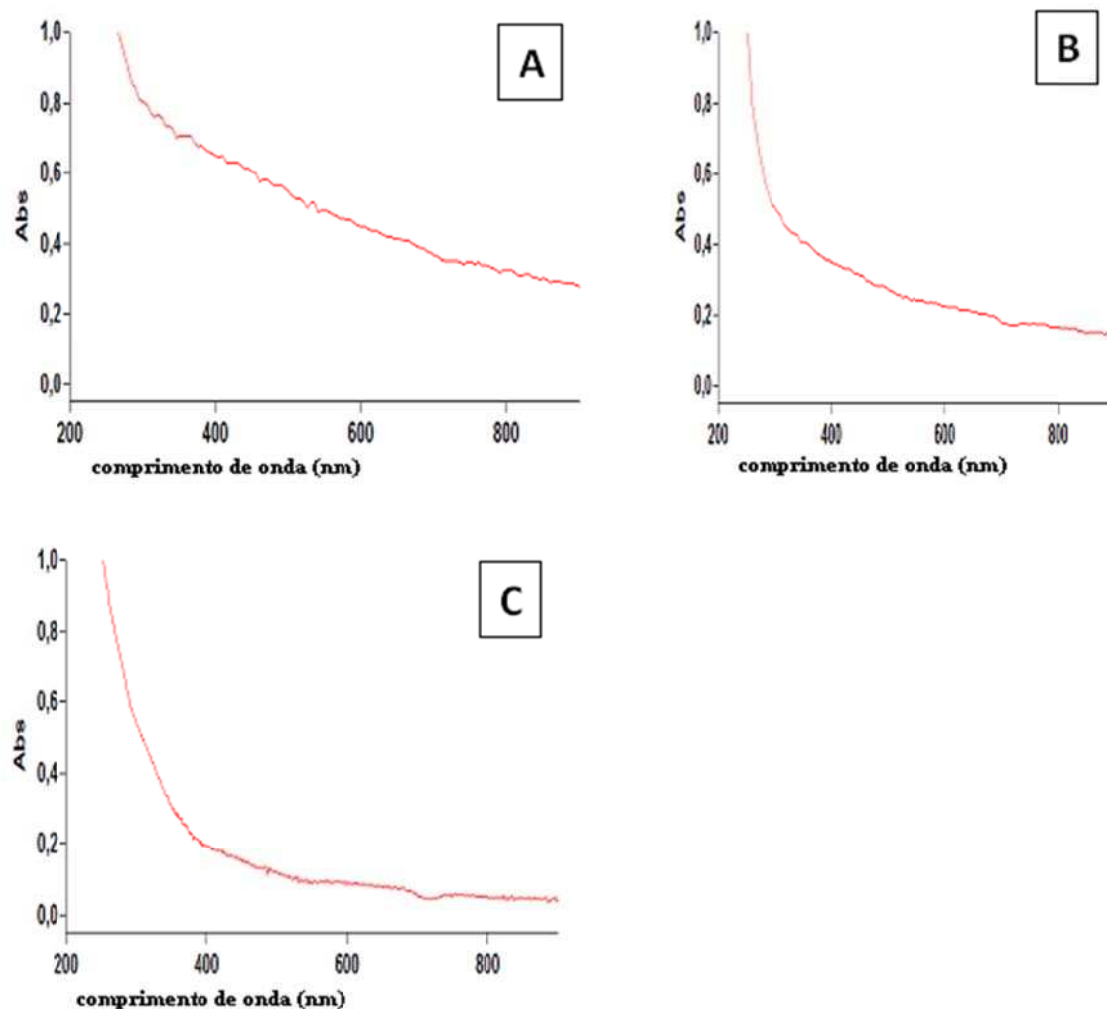


Figura 49: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* com ácido fúlvico no 10º dia (A), após a utilização do reator estático (B) e 24 horas após a utilização do reator estático (C).

A produção enzimática para os testes com o ácido húmico tanto de *P. sanguineus* como de *T. villosa* foram promissoras, mas nitidamente pelas fotografias (figura 50) e pelos espectros (figura 51, 52) a diminuição da absorbância em função do comprimento de onda foi maior em *T. villosa* em presença de ácido húmico, isso também pode ser visto a olho nu durante os experimentos.

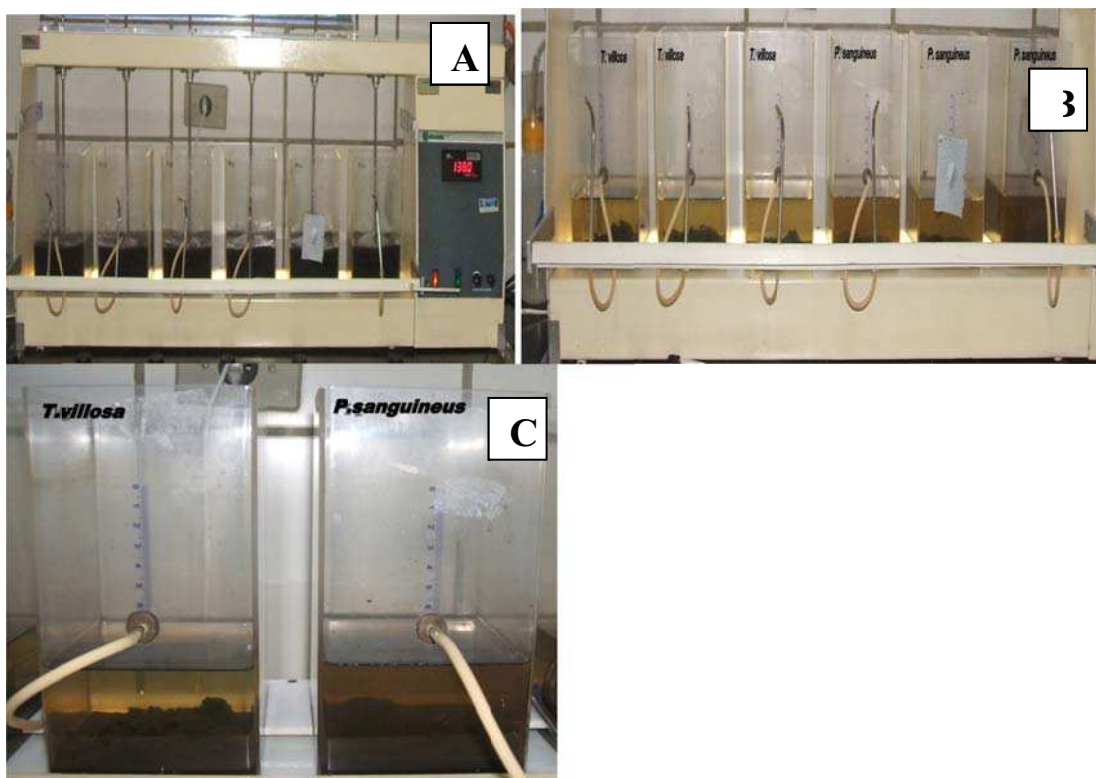


Figura 50: Fotografias dos experimentos em reator estático (Jar Test) contendo as amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico e *Pycnoporus sanguineus*; (A) os três primeiros jarros são de *Trametes villosa*, e os três últimos *Pycnoporus sanguineus* (A) – fotografia no momento do experimento, (B) fotografia do final do experimento em reator estático (Jar Test) (30 min. depois do início do ensaio) (C) fotografia comparando o primeiro jarro com as amostras de *Trametes villosa* e o segundo com amostras contendo *Pycnoporus sanguineus* no final do experimento em reator estático (Jar Test) (30 min. depois do início do experimento).

As amostras de *P. sanguineus* em experimentos com ácido húmico extraído obtiveram um índice percentual de remoção no primeiro trecho de 68% em comparação das amostras apresentadas na final dos experimentos em Jar Test e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação e um índice percentual de remoção de 77% no primeiro trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Já no segundo trecho os índices de remoção foram de 71% em comparação com as amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, e de remoção de 86% no segundo trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Resultados apresentados na figura 51.

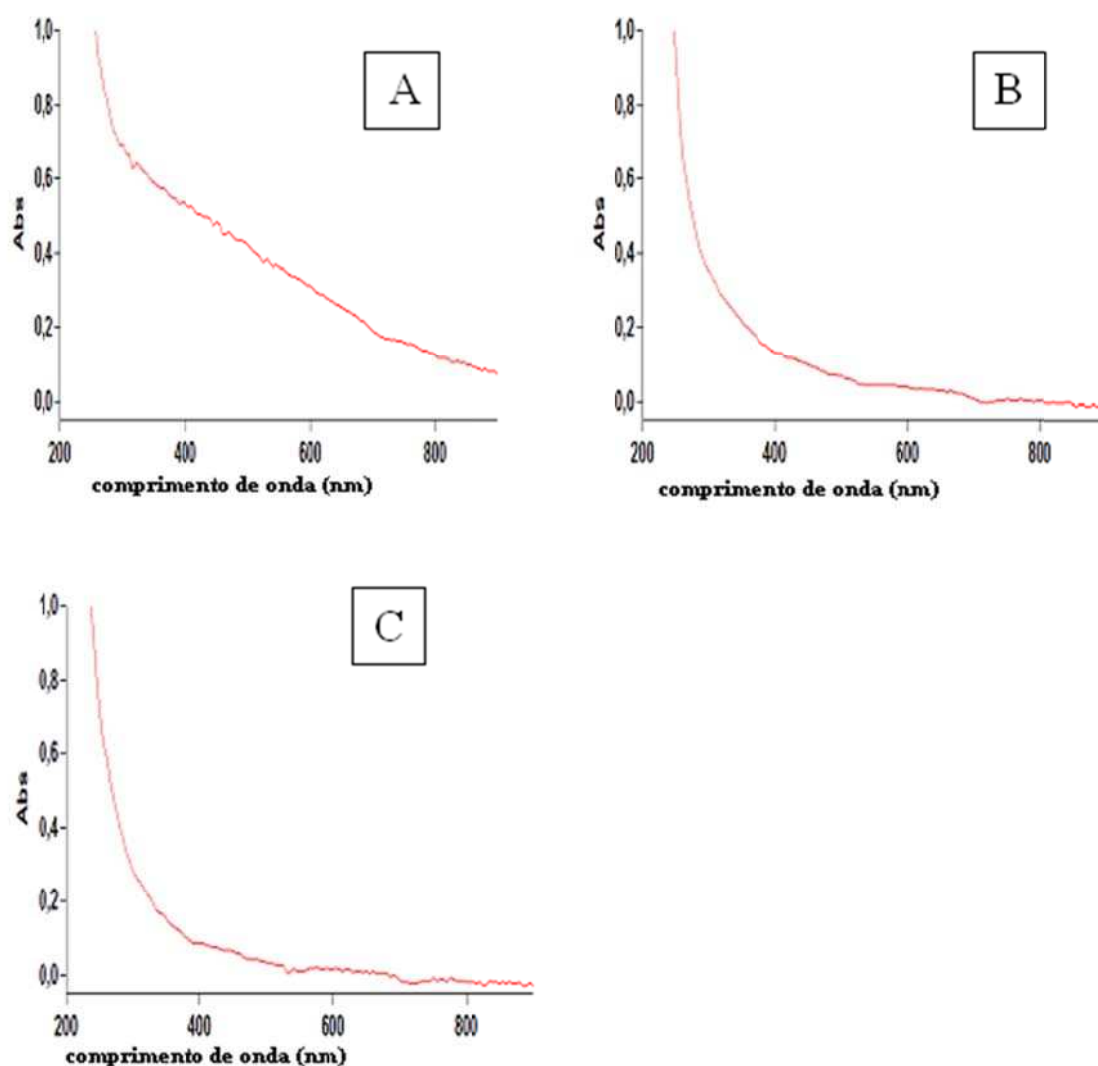


Figura 51: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído no 10º dia após experimento em reator estático (Jar Test) (A), 10 min. após o final do experimento (B) e 24 horas após o final do experimento (C) em Jar Test respectivamente.

As amostras de *P. sanguineus* em ácido húmico extraído obtiveram um índice percentual de remoção no primeiro trecho de 48% em comparação das amostras apresentadas no final dos experimentos com as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação, também foi encontrado um índice percentual de remoção de 57% no primeiro trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Já no segundo trecho os índices de remoção foram de 22% em comparação das amostras apresentadas no final dos experimentos e as amostras apresentadas depois de 10 min. de decantação e um percentual de remoção de 56% no

segundo trecho em relação as amostras obtidas depois de 24h da finalização do experimento. Resultados apresentados na figura 52.

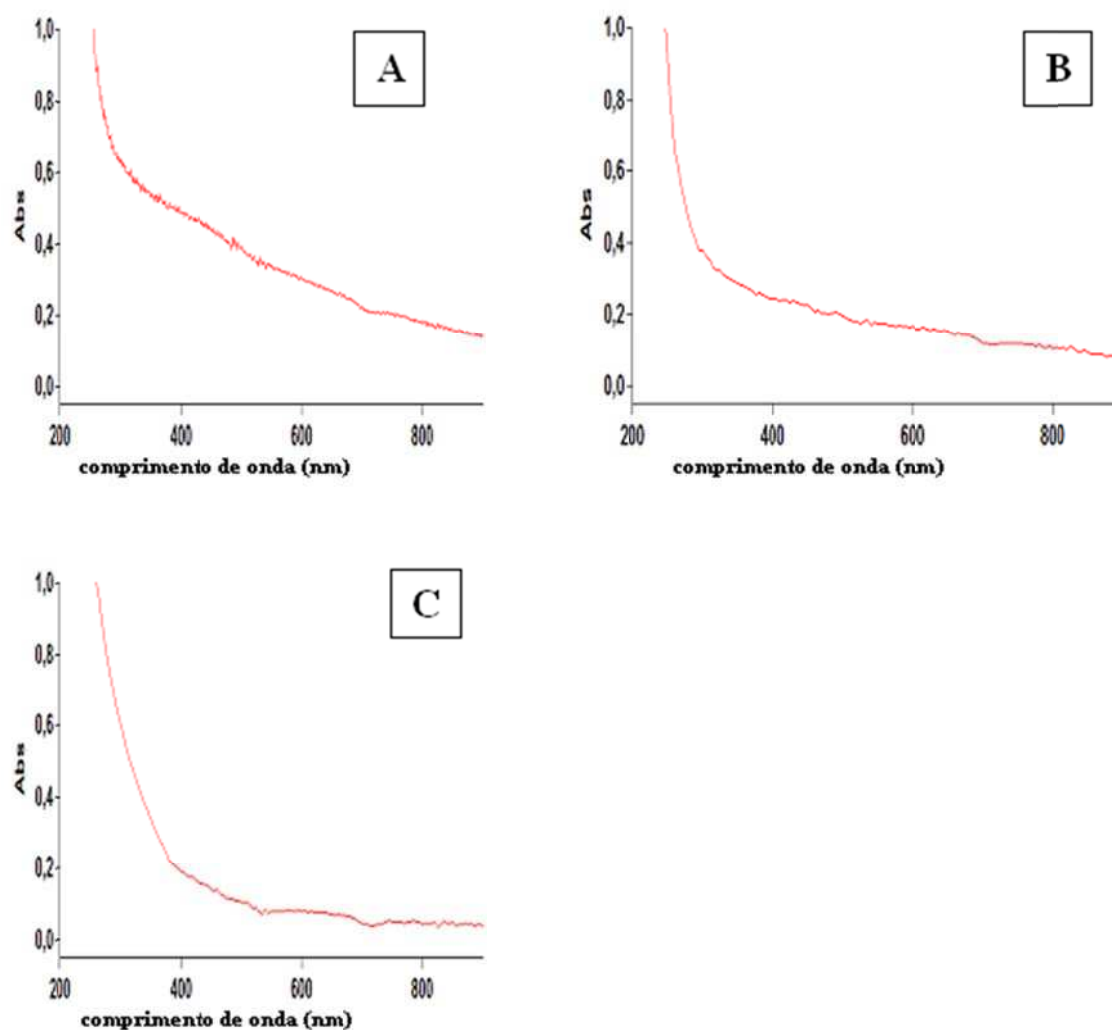


Figura 52: Espectros de ultravioleta e visível (UV-Vis) das amostras de *Pycnopus sanguineus* com ácido húmico extraído no 10º dia após experimento em reator estático (Jar Test) (A), após 10 min. da finalização dos experimentos (B) e 24 horas após o final do experimento em reator estático (C) respectivamente.

7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Perante os resultados obtidos na parte experimental e das correlações com as informações pré-existent, consideram-se que os fungos do presente estudo apresentam potencial de degradação e de adsorção das substâncias húmicas presentes na água.

Outras conclusões específicas a seguir:

1. Pelas análises de espectroscopia no infravermelho os ácidos húmicos extraídos apresentaram grupos carboxílicos, alquílicos, aromáticos, alcoólicos, fenólicos e carboidratos;
2. O método de extração utilizado foi eficaz nas extrações dos ácidos húmicos e fúlvicos;
3. A enzima predominante em todas as espécies fúngicas utilizadas foi a Lcc;
4. O *T. villosa* na maioria dos experimentos obteve maior produção enzimática chegando a uma maior produção de $3,48 \text{ U.mL}^{-1}$;
5. O *T. villosa* nos índices percentuais de remoção foi o que obteve maior uniformidade nos resultados obtendo resultados mais constantes;
6. *P. sanguineus* nos índices percentuais de remoção foi o que obteve um índice percentual maior de remoção, com um índice de 92% no segundo trecho resultado que ocorreu de forma isolada, perante os demais resultados encontrados nos cálculos de índices percentuais de remoção nos experimentos na Incubadora Shaker em testes com os ácidos em estudo;
7. *T. villosa* foi também o fungo que apresentou maior adsorção em comparação com *P. sanguineus*, o que foi visivelmente comprovado pelos espectros de UV-vis e chegou a obter um índice percentual de adsorção nos experimentos em Incubadora Shaker para Teste de Adsorção obtendo um índice percentual de 68% de adsorção;

8. *T. villosa* foi o fungo que apresentou maior frequência de maiores índices percentuais de remoção em comparação com *P. sanguineus* em reator estático, o que foi visivelmente comprovado pelos espectros de UV-vis e chegando a obter um índice de remoção depois de 24 horas do final do experimentos de 86%, *P. sanguineus* obteve uma remoção em um experimento no segundo trecho de 92%, percentual que ocorreu somente em um dos experimentos não sendo um resultado constante;
9. *T. villosa* se mostrou em todos os ensaios o maior produtor de Lcc isso pode ser comprovado observando pela produção enzimática da Lcc em todos os ensaios;
10. Os fungos nos ensaios feitos no Jar Test funcionaram como um agente coagulante.

Para complementação dos resultados obtidos e continuidade da pesquisa, recomenda-se:

1. Utilizar o ácido fúlvico e húmico em outras concentrações;
2. Analisar as amostras coletadas tanto nos ensaios da incubadora agitadora (Shaker), quanto nos ensaios em reator estático (Jar Test) e aplicar o método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa a fim de determinar quantitativamente a porcentagem de degradação ou transformação das substâncias húmicas e fúlvicas; análise não realizada por falta de infraestrutura tecnológica;
3. Desenvolver estudos de aplicabilidade de fungos no tratamento de água com presença de ácidos húmicos e fúlvicos;
4. Recomenda-se a utilização de meio de cultura mais concentrado, para uma maior produção enzimática, o que pode melhorar o desempenho na degradação dos ácidos em estudo;

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, R. M.; CASTILHOS, R. M. V.; LEAL, O. A.; CASTILHOS, D. D. Avaliação das substâncias húmicas de resíduos orgânicos durante a vermicompostagem. **XVI CIC – pesquisa e responsabilidade ambiental/IX ENPOS – Encontro de Pós Graduação**, nov., 2007.
- AZEVEDO J. C. R.; NOZAKI. J. Análise de fluorescência de substâncias húmicas extraídas da água, solo e sedimento da Lagoa dos Patos – MS. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1324-1329, 2008.
- AZEVEDO, J. C.; TEIXEIRA, M. C.; NOZAKI, J. Estudo espectroscópico de substâncias húmicas extraídas da água, solos e sedimentos da Lagoa dos Patos–MS, Brasil. **SaBios-Revista Saúde e Biologia**, v. 1, n. 2, p. 59-71, 2006.
- BADIS, A.; FERRADJI, F. Z.; BOUCHERIT, A.; FODIL, D.; BOUTOUMI, H. Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soils (Algeria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 3 n. 13 p. 997-1007, December, 2009.
- BARBOSA, D. R.; SANTIAGO, M. F. Descoloração do corante antraquinona (remazol brilhante laranja) por fungos de decomposição branca. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, v. 2, n.2, p. 32-33, 2005.
- BOTERO, W. G.; OLIVEIRA, L. C.; MENDONÇA, A. G. R.; SANTOS A., ROCHA J. C., GOMES V. M. Otimização de extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de amostras de turfa para fins comerciais. **32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- (RASBQ)**, 2009.
- BRUM, M. C. Remoção de ácido húmico da água por precipitação e flotação com a utilização de surfactantes catiônicos. **Dissertação de Mestrado**. UFRJ - Rio de Janeiro, RJ, 2005.
- CAMPOS, S. X. ; VIEIRA, E. M. ; AZEVEDO, E. R. ; BONAGAMBA, T. J. ; BERNARDO, L. Estudo Comparativo de Remoção de Cor de Águas Preparadas com Substâncias húmicas de Diferentes Características. In: **XXX Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**, 2006, Punta del Este. Anais Eletrônicos do Evento - CD, 2006.
- CAMPOS, S. X.; DI BERNARDO L., VIEIRA, E. M. Influência das características das substâncias húmicas na eficiência da coagulação com sulfato de alumínio. **Engenharia sanitária ambiental**, v.10, v. 3, abr-jun, 2000.
- CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. AZEVEDO, E. R.; BONAGAMBA T. J. Características das substâncias húmicas e as teorias sobre suas estruturas. **30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia – SP**, 2007. CD-ROM.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researcher. **Journal Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CLAUS, H.; FILIP, Z. Degradation and Transformation of Aquatic Humic Substances by Laccase-producing Fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v 23, p. 180-185, May 1998.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005)**. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, 23p.

DI BERNARDO, L. ; CAMPOS, S. X.; VIEIRA E. M. Características das substâncias húmicas e coagulação de águas com cor alta. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, (ABES) - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, p.1-6, 2005.

DUARTE, L. T. Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnosporus sanguineus* CCT-4518. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Farmácia/UFG, 67p. 2009.

FLORES, C.; VIDAL, C.; HERNÁNDEZ, M. R. T.; GALINDO, E.; CARREÓN, L. S. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 249–257, Jan. 2009.

FREITAS NETO, M. A.; FELIX, J. P. L.; ARTHAUD, I. D. B.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos. **Revista Tecnologia**, Fortaleza, v. 28, n. 1, p. 85-96, jun. 2007.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. Studies on the *Pycnosporus sanguineus* laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 311-318, 2007.

GARCIA, T. A. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnosporus sanguineus* – **Tese (Doutorado) – ICB** - Departamento de Biologia molecular/Universidade de Brasília-DF, 2006.

GRINHUT, T. ; HADAR, Y.; CHEN, Y. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 179-189, Nov., 2007.

HIRAI, H.; NAKANISH, S.; NISHIDA, T. Oxidative dechlorination of metoxichlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, v. 55, p. 641-645, 2004.

JARDIM, V. L. Seleção de fungos de decomposição branca produtores de enzimas oxidativas na presença de acefato para redução de sua toxicidade. **Universidade Federal de Goiás, UFG**, Dissertação de mestrado, 131 p. 2010.

JULIO, M.; NEVES, E. F. A.; TROFINO, J. C.; DI BERNARDO, L. Emprego do reagente de fenton como agente coagulante na remoção de substâncias húmicas de água por meio da flotação por ar dissolvido e filtração. **Engenharia sanitária ambiental**, v. 11, n. 3, jul/set, p. 260-268, 2006.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Left.**, n. 169, p. 247-250, 1984.

LIMA, M. X. V. F. Avaliação de resinas de troca iônica para o tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado) **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFV, Viçosa- MG**, 54 p. 2001.

LOSS, A.; PEREIRA, M. G.; BRITO, R. J. Distribuição das substâncias húmicas em solos de tabuleiros sob diferentes coberturas vegetais. **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 26, n 1, p.57-69, jan-jun, 2006.

MACEDO, R. C.; BERBERT, V. H. C.; LEMOS, J. L. S.; TRINDADE, P. V. O.; RIZZO, A. C. L. MACEDO, R.C.; BERBERT, V.H.C. (2002). Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos. **In: X jornada de Iniciação científica – Anais. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral –CETEM**, 2002.

MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A; MORAIS R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 481-487, 2006.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONOMI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MACIEL, M. J. M.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, H. C. T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review *Electron. J. Biotechnol.* . 2010, v. 13, n. 6, p. 1-13, 2010.

MEDEIROS, G. E.; BROCCHI, E. A. Pirólise de biomassa e obtenção de substâncias húmicas. **XV Seminário de Iniciação Científica PUC - Rio Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia**, Agosto 2007.

MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. Métodos de Seleção de Microrganismos Antagônicos a Fitopatógenos. **Manual Técnico. 1. ed. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente**, 1995. v. 1. 72 p.

MINUSSI R. C. Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fúngica. Tese (Doutorado) - **Faculdade de Engenharia de Alimentos /UNICAMP**, 87p.; 2002.

MINUSSI R. C., MORAES S.G.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. **Letters in Applied Microbiology**.v. 33, n.1 p 21-25, 2001.

MIRANDA, A. B.; TEIXEIRA, B. A. do N. Indicadores para o monitoramento da sustentabilidade em sistemas urbanos de água e esgotamento sanitário, **Engenharia Sanitária e ambiental (ABES)**, v. 9, n. 4, p. 269-279, out./dez. 2004.

MOREIRA NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação (mestrado) - **Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente**, São Paulo, 110 p. 2006.

MOREIRA, A. B.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, A.; ROCHA, J. C.; SANTOS, A. R. S.; BISINOTI, M. C. Fracionamento de substâncias húmicas por ultrafiltração: Um sistema simples e versátil. **31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ)**, 2008.

MUNARI, F. M. ; GAIO, T. A.; DILLON, A. J. P. (2003). Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. **Artigo apresentado na XIV SINAFERM, Florianópolis, Brasil**, 2003.

ONNEBY, K. JONSSON, A.; STENSTROM. J. A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide-degrading microrganismos. **Biodegradation**, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2010.

PADILHA, G. S.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B.; CURVELO SANTANA, J. C.; FERREIRA, J. F. Purificação de lípases em coluna de cromatografia de troca iônica com leito expandido. **48º CBQ (XLVIII Congresso Brasileiro de Química**, Tema: “Química na Proteção ao Meio Ambiente e à Saúde”), set./out., 2008.

POINTING S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Descoloration of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnosporus sanguineus* producing laccase an the sole phenol oxidase. **Wold Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 317-318, 2000.

PAULA, J. R. Estudo da influência das substâncias húmicas na absorção de metais por plantas através de técnicas analíticas. Dissertação (mestrado) - IFQSC/Universidade de São Carlos- SP, 1992. 93 p.

POLLI, V. R. G.; SANTOS, M. A. S.; VENDRAME Z. B.; M.; FRANCO, A. E.; PASINI S. M. Estudo da complexação entre as substâncias húmicas e o íon cobre em solução aquosa. **XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul)**, FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

RESENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, F. D.; HADDAD, R.; DEKKER, R. F. H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryospheria rhodina*, cultured on basal medium containing the

herbicide, Scepter® (imazaquin), **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 454-474, 2005.

REZACOVA, V.; GRYNDLER, M. Fluorescence spectroscopy: a tool to characterize humic substances in soil colonized by microorganisms? **Folia Microbiol.** v. 51, n. 3, p. 215–221, 2006.

ROCHA, J. C.; ZARA L. F.; ROSA, A. H.; SARGENTINI JUNIOR, É; BURBA, P. Substâncias húmicas: sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 410- 412, 2000.

ROSA, A. H., ROCHA; J. C.; FURLAN M.. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 472-476, 2000.

ROSALES, M. A.; OLIVEIRA, O. S.; MOURA, M. A.; LOURES, E. G. Influência das adubações orgânicas e mineral contínuas sobre as características das frações das substâncias húmicas do solo. **Revista Ceres**, v. 46 n. 263, p. 67-81, 1999.

SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTOS, E. M. A.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M.; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Pós-tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 9, n 1, jan/mar, p. 73-81, 2004.

SANEAGO, Manual de operação de estação de tratamento de água; **Apostila - Gerência de desenvolvido de pessoal**, 2005. 119 p.

SANTOS, A. B. Fundamentos da biotecnologia aplicada à remoção de cor de esgotos têxteis. **Revista Tecnologia**, Fortaleza, v. 26, n. 1, p. 80-90, jun. 2005.

SANTOS, A. B.; MATSUMOTO, T. Remoção de cor da água de abastecimento em diferentes níveis de pH. In: Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; AIDIS. Gestión inteligente de los recursos naturales: desarrollo y salud. **XXVIII Congreso interamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental-FEMISCA: México**, p.1-4, out., 2002.

SANTOS, E. M. A.; SAMPAIO, G. M. M. S.; LEITÃO, R. C.; FACÓ, A. M.; MENEZES, E. A.; SANTAELLA, S. T. Influência do tempo de detenção hidráulica em um sistema UASB seguido de um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju. **Engenharia sanitária ambiental**, v.11, n. 1- jan/mar, p. 39-45, 2006.

SANTOS, H. O.; LOURENÇO, S. R.; OLIVEIRA, A. F. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas com uso de espectroscopia de UV-VIS. **Revista Tecnológica**, v. 17, p. 29-38, 2008.

SARGENTINI JUNIOR, É.; ROCHA J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos

internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, n 3, p. 339-344, 2001.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Agrotóxicos aspectos gerais. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F (Org.). **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: EMBRAPA, 2004, cap. 1, p. 17-67.

SILVA, S. R.; RABELO, J. N.; LUCENA, R. M. S.; SANTAELLA, S. T. Tratamento de água residuária utilizando o fungo *aspergillus niger* isolado do efluente de uma refinaria de petróleo. **48º Congresso Brasileiro de Química, IC- Iniciação Científica**, Rio de Janeiro/RJ, 2008.

SIMÕES, M. L.; SANTOS, L. M.; SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; MELO, W. J.; MARTIN-NETO, L. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos submetidos à adição de lodo de esgoto por ressonância paramagnética eletrônica (RPE). **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASQ)**, 2006.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, jan./abr. 2009.

STEFFEN, K. T.. Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. Dissertation in Microbiology - **Department of Applied Chemistry and Microbiology**, University of Helsinki, Helsinki 2003.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenol oxidases and peroxidases by woodrotting fungi. **Mycologia**, v.81, n.2, p.234-240, 1989.

TANGERINO, E. P.; DI BERNARDO, L. Remoção de substâncias húmicas em sistema de oxidação com peróxido de hidrogênio e ozônio In: Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; AIDIS. Gestión inteligente de los recursos naturales: desarrollo y salud. **XXVIII Congreso interamericano de Ingeniería Sanitaria Y Ambiental- FEMISCA: México**, p.1-6, out., 2002.

TANGERINO, E. P.; DI BERNARDO, L. Remoção de substâncias húmicas por meio da oxidação com ozônio e peróxido de hidrogênio e FIME. **Engenharia sanitária ambiental**, v. 10, n. 4 out/dez, p. 290-298, 2005.

TEIXEIRA, M. R.; LUCAS, H.; ROSA, M. J. Remoção de matéria orgânica natural por ultrafiltração. caso de estudo: ETA de alcantarilha. **Actas do 2º Encontro Nacional de Entidades Gestoras de Água e Saneamento - ENEG 2001**. Lisboa, 9 a 11 de Outubro 2001.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂ O₂ - requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 8, p. 2280–2284, 1984.

WIECHETECK, G. K.; BENINI, B. D. D. S.; LUIZ DI BERNARDO Remoção de substâncias húmicas utilizando dupla filtração com filtro ascendente de areia grossa ou de pedregulho. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 9, n. 2, abr/jun, p. 156-164, 2004.

ZHOU, J. L.; BANKS, C. J. Mechanism of humic acid colour removal from natural waters by fungal biomass biosorption. **Chemosphere**, v. 27, n. 4, p. 607-620, 1993.

ZÚÑIGA U. F. R.; MILORI, D. M. B. P.; SILVA, W. T. L. SIMÕES, M. L.; MARTIN NETO L.; ROCHA, J. C. Monitoramento de Mudanças Estruturais das Substâncias Húmicas Aquáticas do Rio Negro AM em função da sazonalidade. **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

APÊNDICE – A

Atividades Enzimáticas

Quadro A – 01: Atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* com ácido fúlvico.

Lcc	pH 3,0/ frasco 1		Lcc	pH 3,0/ frasco 2		Lcc	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	1,824	0,107		1,959	0,059		0,992	0,050
	1,959	0,050		2,097	0,289		1,884	0,035
Med	1,8915	0,0785	Med	2,028	0,174	Med	1,438	0,0425

Lcc	pH 5,0/ frasco 1		Lcc	pH 5,0/ frasco 2		Lcc	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	1,472	0,062		1,264	0,016		1,577	0,025
	1,369	0,045		1,406	0,029		2,586	0,055
Med	1,4205	0,0535	Med	1,335	0,0225	Med	2,0815	0,04

Lcc	pH 7,0/ frasco 1		Lcc	pH 7,0/ frasco 2		Lcc	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	1,209	0,007		1,564	0,016		1,200	0,020
	1,197	0,059		1,39	0,072		1,455	0,097
Med	1,203	0,033	Med	1,477	0,044	Med	1,3275	0,0585

LiP	pH 3,0/ frasco 1		LiP	pH 3,0/ frasco 2		LiP	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
U/mL	10°	15°	U/mL	15°		U/mL	10°	15°
	0,39	0,0		0,39	0,003		0,23	0,002
	0,32	0,0		0,31	0,001		0,30	0,001
Med	0,355	0,0	Med	0,35	0,002	Med	0,265	0,0015

LiP	pH 5,0/ frasco 1		LiP	pH 5,0/ frasco 2		LiP	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
U/mL	10°	15°	U/mL	15°		U/mL	10°	15°
	0,40	0,001		0,36	0,001		0,31	0,001
	0,37	0,000		0,43	0,001		0,38	0,002
Med	0,385	0,001	Med	0,395	0,001	Med	0,345	0,0015

Quadro A – 01: Atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico (continuação...)

LiP	pH 7,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
	10°	15°
	0,24	0,0010
	0,29	0,0000
Med	0,265	0,0005

LiP	pH 7,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
	15°	
U/mL	0,30	0,000
	0,37	0,002
Med	0,335	0,001

LiP	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,31	0,001
	0,41	0,000
Med	0,36	0,0005

MnP	pH 3,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,34	0,000
	0,42	0,000
Med	0,38	0,0

MnP	pH 3,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,43	0,0
	0,41	0,0
Med	0,42	0,0

MnP	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,23	0,0
	0,21	0,0
Med	0,22	0,0

MnP	pH 5,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,22	0,000
	0,45	0,002
Med	0,335	0,001

MnP	pH 5,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,21	0,001
	0,11	0,000
Med	0,16	0,0005

MnP	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,13	0,00
	0,32	0,00
Med	0,225	0

MnP	pH 7,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,24	0,0
	0,29	0,0
Med	0,265	0

MnP	pH 7,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,24	0,0
	0,35	0,0
Med	0,295	0

MnP	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,31	0,001
	0,42	0,000
Med	0,365	0,0005

Quadro A – 02: Atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido fúlvico.

Lcc	pH 3,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	2,04	0,033
	2,1	0,031
Med	2,07	0,032

Lcc	pH 3,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	3,12	0,024
	2,13	0,021
Med	2,625	0,0225

Lcc	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	2,45	0,034
	1,980	0,026
Med	2,215	0,030

Lcc	pH 5,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	1,76	0,007
	3,23	0,015
Med	2,495	0,011

Lcc	pH 5,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	2,17	0,023
	1,46	0,027
Med	1,815	0,025

Lcc	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	3,35	0,014
	2,13	0,060
Med	2,74	0,037

Lcc	pH 7,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	2,03	0,040
	2,74	0,011
Med	2,385	0,0255

Lcc	pH 7,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	1,56	0,040
	2,13	0,014
Med	1,845	0,027

Lcc	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	1,94	0,056
	1,55	0,014
Med	1,745	0,035

LiP	pH 3,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,11	0,0
	0,09	0,0
Med	0,1	0,0

LiP	pH 3,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	15°	
	0,12	0,0
	0,11	0,0
Med	0,115	0,0

LiP	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,13	0,0
	0,12	0,0
Med	0,125	0,0

LiP	pH 5,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,14	0,0
	0,13	0,0
Med	0,135	0

LiP	pH 5,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	15°	
	0,15	0,0
	0,12	0,0
Med	0,135	0,0

LiP	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,143	0,0
	0,150	0,0
Med	0,1465	0,0

Quadro A – 02: Atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido fúlvico (continuação...)

LiP	pH 7,0/ frasco 1		LiP	pH 7,0/ frasco 2		LiP	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF		sem AF	com AF		sem AF	com AF
	10°	15°	U/mL	15°			10°	15°
	0,12	0,0		0,11	0,001		0,09	0,001
	0,12	0,0		0,09	0,000		0,08	0,000
Med	0,12	0,0	Med	0,1	0,0005	Med	0,085	0,0005

MnP	pH 3,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,002	0,0
	0,001	0,0
Med	0,0015	0

MnP	pH 3,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,003	0,0
	0,001	0,0
Med	0,002	0

MnP	pH 3,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,0	0,0
	0,0	0,0
Med	0	0

MnP	pH 5,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,03	0,0
	0,02	0,0
Med	0,025	0

MnP	pH 5,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,192	0,03
	0,153	0,02
Med	0,1725	0,025

MnP	pH 5,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,123	0,01
	0,111	0,01
Med	0,117	0,01

MnP	pH 7,0/ frasco 1	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,001	0,0
	0,0	0,0
Med	0,0005	0

MnP	pH 7,0/ frasco 2	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0,0	0,0
	0,0	0,0
Med	0	0

MnP	pH 7,0/ frasco 3	
	sem AF	com AF
U/mL	10°	15°
	0	0,001
	0	0,000
Med	0	0,0005

Quadro A – 03: Atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico da Sigma-Aldrich®

Lcc	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	3,16	0,405
	4,7	0,205
Med	3,93	0,305

Lcc	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	3,270	0,108
	2,927	0,203
Med	3,0985	0,1555

Lcc	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	2,70	0,850
	2,9	0,799
Med	2,8	0,8245

LiP	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,35	0,001
	0,23	0,001
Med	0,29	0,0

LiP	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	15°	
	0,32	0,0
	0,39	0,0
Med	0,355	0,0

LiP	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,34	0,001
	0,42	0,0
Med	0,38	0,0

MnP	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,42	0,0
	0,21	0,0
Med	0,315	0,0

MnP	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,25	0,0
	0,47	0,0
Med	0,36	0,0

MnP	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,25	0,00
	0,28	0,001
Med	0,265	0,0

Quadro A – 04: Atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico extraído

Lcc	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	3,21	0,029
	2,13	0,225
Med	2,67	0,127

Lcc	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	3,12	0,038
	1,89	0,225
Med	2,505	0,1315

Lcc	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	1,55	0,037
	2,58	0,190
Med	2,065	0,1135

LiP	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,4	0,002
	0,31	0,0
Med	0,355	0,0

LiP	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	15°	
	0,32	0,000
	0,39	0,001
Med	0,355	0,0

LiP	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,25	0,0
	0,36	0,0
Med	0,305	0,0

MnP	frasco 1	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,34	0,09
	0,19	0,003
Med	0,265	0,0

MnP	frasco 2	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,43	0,002
	0,32	0,001
Med	0,375	0,0

MnP	frasco 3	
	sem AH	com AH
U/mL	10°	15°
	0,22	0,003
	0,4	0,001
Med	0,31	0,0

Quadro A – 05: Atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

Lcc	frasco 1		Lcc	frasco 2		Lcc	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	3,850	0,07		3,900	0,2		2,151	0,01
	3,711	0,02		3,998	0,34		3,277	0,03
Med	3,7805	0,045	Med	3,949	0,27	Med	2,714	0,02

LiP	frasco 1		LiP	frasco 2		LiP	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	15°		U/mL	10°	15°
	0,1	0,0		0,23	0,0		0,08	0,0
	0,12	0,0		0,27	0,0		0,097	0,0
Med	0,11	0,0	Med	0,25	0,0	Med	0,0885	0,0

MnP	frasco 1		MnP	frasco 2		MnP	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	0,25	0,0		0,09	0,0		0,12	0,0
	0,14	0,0		0,15	0,0		0,11	0,0
Med	0,195	0,0	Med	0,12	0,0	Med	0,115	0,0

Quadro A – 06: Atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido húmico extraído

Lcc	frasco 1		Lcc	frasco 2		Lcc	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	2,713	0,34		3,680	0,1		2,164	0,1
	2,260	0,07		2,125	0,3		2,707	0,2
Med	2,4865	0,205	Med	2,9025	0,2	Med	2,4355	0,15

LiP	frasco 1		LiP	frasco 2		LiP	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	15°		U/mL	10°	15°
	0,2	0,0		0,09	0,0		0,13	0,0
	0,1	0,0		0,1	0,0		0,18	0,0
Med	0,15	0,0	Med	0,095	0,0	Med	0,155	0,0

MnP	frasco 1		MnP	frasco 2		MnP	frasco 3	
	sem AH	com AH		sem AH	com AH		sem AH	com AH
U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°	U/mL	10°	15°
	0,130	0,002		0,23	0,00		0,20	0,0
	0,12	0,001		0,34	0,001		0,24	0,0
Med	0,125	0,0015	Med	0,285	0,002	Med	0,22	0

Quadro A – 07: Análise de variância - Teste ANOVA da atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	1,79	0,31	1,44	2,03	
pH 5,0	3	1,61	0,41	1,34	2,08	
pH 7,0	3	1,34	0,14	1,20	1,48	
Total	9	1,58	0,33	1,20	2,08	0,269
15 dias						
pH 3,0	3	0,10	0,07	0,04	0,17	
pH 5,0	3	0,04	0,02	0,02	0,05	
pH 7,0	3	0,05	0,01	0,03	0,06	
Total	9	0,06	0,05	0,02	0,17	0,225

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	0,32	0,05	0,27	0,36	
pH 5,0	3	0,38	0,03	0,35	0,40	
pH 7,0	3	0,32	0,05	0,27	0,36	
Total	9	0,34	0,05	0,27	0,40	0,295
15 dias						
pH 3,0	3	0,00117	0,00104	0,00000	0,00200	
pH 5,0	3	0,00117	0,00029	0,00100	0,00150	
pH 7,0	3	0,00067	0,00029	0,00050	0,00100	
Total	9	0,00100	0,00061	0,00000	0,00200	0,579

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	0,34	0,11	0,22	0,42	
pH 5,0	3	0,24	0,09	0,16	0,34	
pH 7,0	3	0,31	0,05	0,27	0,37	
Total	9	0,30	0,09	0,16	0,42	0,396
15 dias						
pH 3,0	3	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	
pH 5,0	3	0,00050	0,00050	0,00000	0,00100	
pH 7,0	3	0,00017	0,00029	0,00000	0,00050	
Total	9	0,00022	0,00036	0,00000	0,00100	0,252

Quadro A – 08: Análise de variância - Teste ANOVA da atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido fúlvico

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	2,30	0,29	2,07	2,63	
pH 5,0	3	2,35	0,48	1,82	2,74	
pH 7,0	3	1,99	0,34	1,75	2,39	
Total	9	2,22	0,37	1,75	2,74	0,495
15 dias						
pH 3,0	3	0,028	0,005	0,023	0,032	
pH 5,0	3	0,024	0,013	0,011	0,037	
pH 7,0	3	0,029	0,005	0,026	0,035	
Total	9	0,027	0,008	0,011	0,037	0,775

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	0,11	0,01	0,10	0,13	
pH 5,0	3	0,14	0,01	0,14	0,15	
pH 7,0	3	0,10	0,02	0,09	0,12	
Total	9	0,12	0,02	0,09	0,15	0,033
15 dias						
pH 3,0	3	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	
pH 5,0	3	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	
pH 7,0	3	0,00033	0,00029	0,00000	0,00050	
Total	9	0,00011	0,00022	0,00000	0,00050	0,079

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max	p
10 dias						
pH 3,0	3	0,0012	0,0010	0,0000	0,0020	
pH 5,0	3	0,1048	0,0745	0,0250	0,1725	
pH 7,0	3	0,0002	0,0003	0,0000	0,0005	
Total	9	0,0354	0,0640	0,0000	0,1725	0,052
15 dias						
pH 3,0	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
pH 5,0	3	0,0117	0,0126	0,0000	0,0250	
pH 7,0	3	0,0002	0,0003	0,0000	0,0005	
Total	9	0,0039	0,0086	0,0000	0,0250	0,159

Quadro A – 09: Análise de variância – Teste Tukey da atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido fúlvico

LiP (U/mL)		p
10 dias		
pH 3,0	Ph 5,0 Ph 7,0	0,117
pH 5,0	Ph 7,0	0,030

Quadro A – 10: Análise de variância – Teste T Pareado da atividade enzimática do *Pycnoporus sanguineus* com ácido fúlvico

Fator	n	Média	DP	p
Lcc (U/mL)				
10 dias	9	1,578	0,330	
15 dias	9	0,061	0,045	<0,001
LiP (U/mL)				
10 dias	9	0,339	0,046	
15 dias	9	0,001	0,001	<0,001
MnP (U/ml)				
10 dias	9	0,296	0,086	
15 dias	9	0,000	0,000	<0,001

Quadro A – 11: Análise de variância – Teste T Pareado da atividade enzimática do *Trametes villosa* com ácido fúlvico

Fator	n	Média	DP	p
Lcc (U/mL)				
10 dias	9	2,215	0,369	
15 dias	9	0,027	0,008	<0,001
LiP (U/mL)				
10 dias	9	0,118	0,020	
15 dias	9	0,00011	0,00022	<0,001
MnP (U/mL)				
10 dias	9	0,035	0,064	
15 dias	9	0,0039	0,0086	0,130

Quadro A – 12: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido fúlvico em reator estático (Jar Test)

Fator	N	Média	DP	Min	Max
10º dia					
Lcc (U/mL)	3	2,12	0,35	1,81	2,50
LiP (U/mL)	3	0,07	0,08	0,02	0,16
MnP (U/mL)	3	0,09	0,02	0,08	0,11
Total	9	0,76	1,04	0,02	2,50
24 h					
Lcc (U/mL)	3	0,67	0,18	0,56	0,88
LiP (U/mL)	3	0,00	0,00	0,00	0,01
MnP (U/mL)	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	9	0,22	0,35	0,00	0,88

Quadro A – 13: Análise estatística descritiva de *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico em reator estático (Jar Test)

Fator	N	Média	DP	Min	Max
10º dia					
Lcc (U/mL)	3	2,83	0,79	1,94	3,43
LiP (U/mL)	3	0,10	0,04	0,06	0,13
MnP (U/mL)	3	0,09	0,03	0,06	0,11
Total	9	1,01	1,42	0,06	3,43
24 h					
Lcc (U/mL)	3	1,26	0,43	0,81	1,66
LiP (U/mL)	3	0,01	0,01	0,00	0,02
MnP (U/mL)	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	9	0,42	0,66	0,00	1,66

Quadro A – 14: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico nos experimentos em reator estático (Jar Test)

Fator	N	Média	DP	Min	Max
10º dia					
Lcc (U/mL)	3	2,02	0,46	1,73	2,55
LiP (U/mL)	3	0,06	0,02	0,04	0,08
MnP (U/mL)	3	0,07	0,05	0,02	0,11
Total	9	0,72	1,00	0,02	2,55
24 h					
Lcc (U/mL)	3	1,01	0,19	0,89	1,24
LiP (U/mL)	3	0,01	0,01	0,00	0,02
MnP (U/mL)	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	9	0,34	0,51	0,00	1,24

Quadro A – 15: Análise estatística descritiva de do *Trametes villosa* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	3,48	0,67	2,71	3,95
15º dia	3	0,11	0,14	0,02	0,27
Total	6	1,80		0,02	3,95

Quadro A – 16: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	2,61	0,26	2,44	2,90
15º dia	3	0,19	0,03	0,15	0,21
Total	6	1,40		0,15	2,90

Quadro A – 17: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,15	0,09	0,09	0,25
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,07		0,00	0,25

Quadro A – 18: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,13	0,03	0,10	0,16
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,06		0,00	0,16

Quadro A – 19: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,14	0,04	0,12	0,20
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,07		0,12	0,20

Quadro A – 20: Análise estatística descritiva de *Trametes villosa* com ácido húmico extraído

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,21	0,08	0,13	0,29
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,11		0,00	0,29

Quadro A – 21: Análise estatística descritiva de *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	3,28	0,59	2,80	3,93
15º dia	3	0,43	0,35	0,16	0,82
Total	6	1,85		0,16	3,93

Quadro A – 22: Análise estatística descritiva de *Pycnoporus sanguineus* com ácido húmico extraído

Lcc (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	2,41	0,31	2,07	2,67
15º dia	3	0,12	0,01	0,11	0,13
Total	6	1,27		0,11	2,67

Quadro A – 23: Análise estatística descritiva de *Pycnopus sanguineus* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,34	0,05	0,29	0,38
15º dia	3	0,00050	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,17		0,00	0,38

Quadro A – 24: Análise estatística descritiva de *Pycnopus sanguineus* com ácido húmico extraído

LiP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,34	0,03	0,31	0,36
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,17		0,00	0,36

Quadro A – 25: Análise estatística descritiva de *Pycnopus sanguineus* com ácido húmico Sigma-Aldrich®

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,31	0,05	0,27	0,36
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,16		0,00	0,36

Quadro A – 26: Análise estatística descritiva de *Pycnopus sanguineus* com ácido húmico extraído

MnP (U/mL)	n	Média	DP	Min	Max
10º dia	3	0,32	0,06	0,27	0,38
15º dia	3	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	6	0,16		0,00	0,38